

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Kateřina Flussová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Srpkovitá anémie a její léčba
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina Flussová**
Osobní číslo: **C21165**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Srpkovitá anémie a její léčba**
Téma práce anglicky: **Sickle Cell Anemia and its Treatment**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma srpkovitá anémie. V úvodní části se zaměřte na popis tohoto onemocnění, příčiny vzniku, průběh a diagnostiku.
2. V hlavní části bakalářské práce se věnujte podrobnějšímu popisu léčby srpkovité anémie. Uveďte a vysvětlete zejména možnost léčby pomocí metody CRISPR.
3. Pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce čerpejte z odborných článků publikovaných v recenzovaných zahraničních časopisech. Jejich vyhledávání provádějte prostřednictvím elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Pavlína Nývltová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Srpkovitá anémie a její léčba jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 20. 06. 2024

Kateřina Flussová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí bakalářské práce Mgr. Pavlíně Nývltové, Ph.D. za odborné vedení, velmi vstřícný přístup, trpělivost a cenné rady, které mi v průběhu psaní bakalářské práce poskytla. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině a přátelům za jejich velkou podporu v průběhu celého studia.

ANOTACE

Bakalářská práce je věnována onemocnění srpkovitá anémie se zaměřením na její léčbu. Zabývá se základním popisem, výskytem, komplikacemi, diagnostikou a léčbou onemocnění. Jsou zde popsány srpkovité erythrocyty, hemoglobin abnormálního typu, který se vyskytuje u srpkovité anémie a také základní patogeneze. Větší část práce je věnována terapii, která je v dnešní době dostupná. V této části se práce zaměřuje zejména na metodu CRISPR, která znamená velký průlom v léčbě tohoto onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA

srpkovitá anémie, erythrocyty, hemoglobin, léčba, CRISPR

TITLE

Sickle cell anemia and its treatment

ANNOTATION

The bachelor thesis is devoted to sickle cell anemia with a focus on its treatment. It deals with the basic description, epidemiology, complications, diagnosis and treatment of the disease. Sickle cell erythrocytes, the abnormal type of hemoglobin that occurs in sickle cell anemia, and the basic pathogenesis are described here. A major part of the work is devoted to the therapies that are currently available. In this part of the thesis, the main focus is on the CRISPR method, which represents a major breakthrough in the treatment of this disease.

KEYWORDS

Sickle cell anemia, erythrocytes, hemoglobin, treatment, CRISPR

OBSAH

ÚVOD.....	11
1 ERYTROCITY	12
1.1 CYTOSKELET.....	12
1.2 HEMOGLOBIN.....	13
1.3 HEMOGLOBINOPATIE	14
2 SRPKOVITÁ ANÉMIE	15
2.1 HEMOGLOBIN S.....	15
2.2 SRPKOVITÉ ERYTROCITY.....	16
2.3 VÝSKYT SRPKOVITÉ ANÉMIE.....	17
3 KOMPLIKACE ZPŮSOBENÉ SRPKOVITOU ANÉMIÍ	18
3.1 VAZOOKLUZE.....	19
3.2 CHRONICKÁ HEMOLYTICKÁ ANÉMIE	20
4 SRPKOVITÁ ANÉMIE Z POHLEDU GENETIKY	20
5 DIAGNOSTIKA A NOVOROZENECKÝ SCREENING.....	21
5.1 KOMPLETNÍ KREVNÍ OBRAZ	22
5.2 NÁTĚR PERIFERNÍ KRVE	23
5.3 SRPKOVITÉ TESTY ROZPUSTNOSTI.....	23
5.4 HEMOGLOBINOVÁ ELEKTROFORÉZA	23
5.4.1 Alkalická elektroforéza.....	23
5.4.2 Elektroforéza na citrátovém agaru.....	24
5.4.3 Kapilární elektroforéza	24
5.6 IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE.....	24
5.7 VYSOKOÚČINNÁ PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE	25
5.8 TECHNIKY ZALOŽENÉ NA POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCI.....	25
6 TERAPIE SRPKOVITÉ ANÉMIE	25
6.1 GENOVÁ TERAPIE.....	25
6.1.1 Metoda CRISPR	27
6.1.1.1 CRISPR-Cas systém u prokaryot.....	28
6.1.1.2 CRISPR-Cas9	30

6.1.1.3 Léčba srpkovité anémie pomocí CRISPR-Cas9	35
6.2 TRANSPLANTACE HEMATOPOETICKÝCH KMENOVÝCH BUNĚK.....	38
6.3 PODPŮRNÁ LÉČBA	40
6.3.1 Hydroxyurea	40
6.3.2 Crizanlizumab	42
6.3.3 L-glutamin	43
6.3.4 Voxelotor	44
6.3.5 Krevní transfuze.....	45
ZÁVĚR	48
POUŽITÁ LITERATURA	49

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AVV	adeno-asociované viry
β0 talasémie	beta nula talasémie
β+ talasémie	beta plus talasémie
Cas protein	protein asociovaný s CRISPR
Cas1	protein 1 asociovaný s CRISPR
Cas2	protein 2 asociovaný s CRISPR
Cas9	protein 9 asociovaný s CRISPR
CRISPR	segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetic
crRNA	CRISPR RNA
dCas9	deaktivovaná endonukleáza Cas9
DSB	dvouřetězcový zlom
EMA	Evropská léková agentura
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
G-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů
GSH	redukováná forma glutationu
GVHD	reakce štěpu proti hostiteli
HbA	hemoglobin dospělého typu
HBB	gen kódující β -globin
HbF	hemoglobin fetálního typu
HbS	hemoglobin abnormálního typu u srpkovité anémie
HDR	homologicky řízená oprava
HGB	hemoglobin
HIV	virus lidské imunodeficiency
HLA	lidský leukocytární antigen
HPFH	dědičná persistence fetálního hemoglobinu
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSC	hematopoetické kmenové buňky
HSCT	transplantace hematopoetických kmenových buněk
HTR	transfuzní hemolytická reakce
NAD	nikotinamid adenindinukleotid
nCas9	nickáza Cas9

NGGN	N-guanin-guanin
NHEJ	nehomologní spojování konců
HNH doména	nukleázová doména s motivem histidin-asparagin-histidin
NUC	nukleázový lalok endonukleázy Cas9
PAM	motiv sousedící s protospacerem
PCR	polymerázová řetězová reakce
PI doména	PAM interagující doména
pre-crRNA	prekurzorová RNA
PSGL-1	P-selektinový glykoproteinový ligand 1
REC	rozpoznávací lalok endonukleázy Cas9
ROS	reaktivní formy kyslíku
sgRNA	vodící RNA
TALEN	nukleázy podobné aktivátorům transkripce
tracrRNA	trans-aktivující RNA
WHO	Světová zdravotnická organizace
ZFN	nukleáza se zinkovým prstem

ÚVOD

Srpkovitá anémie je autozomálně recesivní dědičné onemocnění, způsobené bodovou mutací v genu kódující β -globinový řetězec hemoglobinu. Při této mutaci dochází k substituci adeninu thyminem v 6. kodonu tohoto genu, což vede k náhradě hydrofilní kyseliny glutamové hydrofobním valinem. Výsledkem je přítomnost abnormálního hemoglobinu S v erythrocytech. Jedná se o jedinou variantu hemoglobinu, která polymerizuje v deoxygenovaném stavu, tvoří dlouhé tuhé tyčinky a tím dochází ke stáčení erythrocytů do charakteristického srpkovitého tvaru. Tyto srpkovité erythrocyty jsou rigidní a křehké, což vede k jejich zvýšené destrukci a snížené schopnosti průtoku malými cévami.

Pacienti se srpkovitou anémií čelí řadě zdravotních komplikací, včetně akutních a chronických vazookluzivních krizí, zvýšené náchylnosti k infekcím a poškození orgánů, což zkracuje délku života těchto pacientů. Na celém světě trpí tímto onemocněním milióny lidí, přičemž mezi oblasti s nejvyšším výskytem patří Indie, Arabský poloostrov a oblast subsaharské Afriky, dochází ale k rozšíření po celém světě v důsledku mezinárodní migrace. Diagnostika srpkovité anémie zahrnuje kombinaci klinického hodnocení, laboratorních testů a genetického testování. Cílem je identifikovat přítomnost abnormálního hemoglobinu a posoudit rozsah onemocnění. Screeningové programy a genetická poradenství pomáhají identifikovat osoby ohrožené narozením potomka se srpkovitou anémií. Brzká a přesná diagnóza umožňuje včasné zahájení terapie modifikující onemocnění.

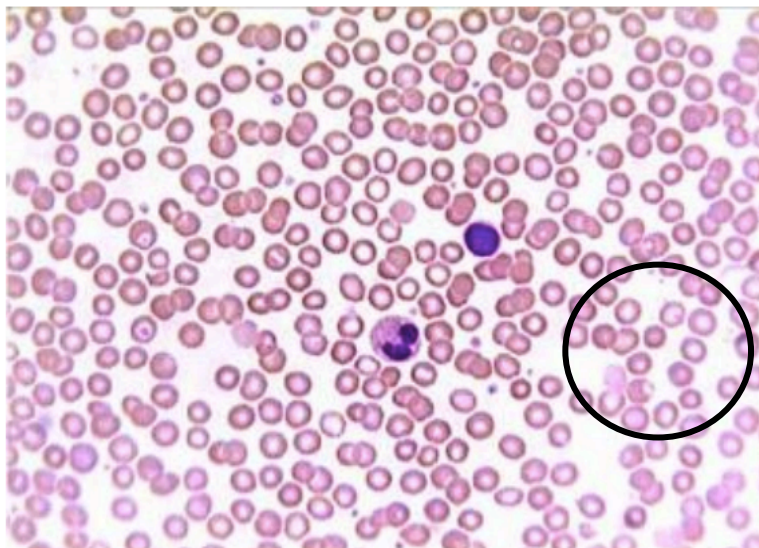
Léčba se zaměřuje zejména na zvládnutí příznaků a prevenci komplikací. V současné době jsou schváleny čtyři léčiva modifikující průběh srpkovité anémie: hydroxyurea, L-glutamin, Voxelotor a Crizanlizumab. První kurativní léčbou byla transplantace hematopoetických kmenových buněk, jejíž široké použití je značně omezeno nutností vhodného dárce. Monogenní povaha srpkovité anémie ji učinila ideálním kandidátem pro léčbu pomocí editace genomu. Americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv schválil 8.12.2023 dvě genové terapie pro léčbu srpkovité anémie, a to CRISPR a Lovo-cel.

1 Erytrocyty

Erytrocyty jsou vysoce diferencované buňky bikonkávního tvaru, jejichž životnost je 120 dní. Zralé červené krvinky postrádají jádro a organely charakteristické pro většinu buněk. Na správné funkčnosti erytrocytů závisí životnost ostatních buněk, jelikož mají nezbytné metabolické schopnosti. Jsou strukturovány tak, aby plnily své základní funkce, kterými jsou dodávání kyslíku ostatním buňkám a odvádění oxidu uhličitého. Obsahují ve své struktuře hemoglobin. Je zde zásadní vztah mezi strukturou a funkcí erytrocytů (Risinger et al., 2020).

1.1 Cytoskelet

Zásadní roli ve schopnosti erytrocytů přežít hraje pružnost jejich membrány, kdy je pro jejich funkčnost důležité, aby zůstávala neporušená. Erytrocyty jsou jedinečně deformovatelné, jsou schopné reverzibilních změn svého tvaru při průchodu cévami (Bettioli et al., 2022). Pružnost membrány a tvar erytrocytů jsou zajištěny erytrocytárním cytoskeletem. Ten se skládá z proteinů jako jsou spektrin, ankyrin a aktin, které společně vytvářejí vláknitou síť. Tyto cytoskeletární proteiny reagují společně s membránovými proteiny a lipidy membránové dvojvrstvy na udržení integrity membrány. Nedostatky v cytoskeletu tedy vedou k nestabilitě membrány (Smith, 1987). Na obrázku č. 1 je uveden mikroskopický snímek panopticky obarveného krevního nátěru, na kterém lze vidět fyziologické kulovité erytrocyty s centrálním projasněním. V černém kruhu jsou vyznačeny tyto erytrocyty.



Obrázek 1: **Fyziologické erytrocyty.** Upraveno dle (Maitra et al., 2012).

1.2 Hemoglobin

Hemoglobin (HGB) je metaloprotein, jehož hlavní funkcí v lidském těle je transport kyslíku z plic do tkání. Jedná se o tetramer složený ze dvou heterodimerů, kdy každá z těchto čtyř podjednotek obsahuje bílkovinou globinovou část a nebílkovinnou část hem. Každá podjednotka může vázat jednu molekulu kyslíku, proto je jedna molekula HGB schopna transportovat až čtyři molekuly kyslíku. Hem je sloučenina tvořena porfyrinovým kruhem, uprostřed něhož se nachází iont železa a je připojen pomocí kovalentní vazby ke globinové části (Ahmed et al., 2020). Aby molekula HGB byla schopna navázat kyslík, musí se železo hemu nacházet ve své redukované formě, a to jako železnatý kationt (Thom et al., 2013). Jedinečná struktura molekuly HGB umožňuje to, že navázání atomu kyslíku železem v jedné ze čtyř podjednotek vyvolá konformační změnu, které vede ke zvýšené afinitě ke kyslíku u zbývajících podjednotek HGB (Glaros et al., 2021).

Globinová část se skládá ze čtyř polypeptidů. Přesněji obsahuje dvě dvojice polypeptidů, kdy vždy obsahuje jednu dvojici α -globinových řetězců a druhou dvojici β -globinových řetězců. Všechny lidské HGB mají stejný hem a liší se ve složení globinových řetězců, kdy právě na základě toho, jaké varianty polypeptidových řetězců jsou zastoupeny, rozlišujeme typy HGB. Expresí jednotlivých typů a jejich zastoupení se v průběhu života jedince přirozeně mění. Tyto různé typy HGB mají poté rozdílnou afinitu k molekule kyslíku (Ahmed et al., 2020).

Mezi fyziologické varianty HGB u člověka řadíme hemoglobin fetálního typu (HbF), kdy u tohoto typu nacházíme dva polypeptidové řetězce α a dva γ . Dále do této skupiny HGB řadíme dospělou formu hemoglobinu (HbA), u něhož se vyskytují dva polypeptidové řetězce α a dva β (Wilber et al., 2011). Tyto polypeptidové řetězce jsou tvořeny z osmi šroubovic označených A–H, které se skládají do globulárních struktur a na každé podjednotce se nachází vazebné místo pro hem, které je tvořeno šroubovicemi E-F (Thom et al., 2013). Funkce HGB závisí na rovnováze mezi dvěma stavy, ve kterých se může nacházet. A to napjatým T stavem, který vykazuje nízkou afinitu ke kyslíku a uvolněným R stavem, který má vysokou afinitu ke kyslíku. To dovoluje HGB účinně uvolňovat a vychytávat kyslík (Ahmed et al., 2020).

1.3 Hemoglobinopatie

Mezi hemoglobinopatie řadíme onemocnění způsobená genetickou poruchou v genech kódujících syntézu HGB, jejichž následkem vzniká porucha ve struktuře nebo funkci HGB (Harteveld et al., 2022). Na chromozomu 16 je umístěn α -globinový lokus a obsahuje geny α^1 a α^2 pro syntézu α -globinových řetězců. β -globinový lokus je umístěn na chromozomu 11 obsahuje geny $G_\gamma, A_\gamma, \delta$ a β , ty kódují syntézu ne α -globinových řetězců (Utsugisawa et al., 2022). Hemoglobinopatie patří mezi jedny z nejčastějších monogenních onemocnění, která jsou způsobena mutací v jednom jediném genu a řadí se mezi jedny z největších světových zdravotnických problémů. Tato onemocnění se původně vyskytovala zejména v oblasti Středomoří a dále ve velké části Afriky a Asie, avšak dochází k jejich rozšíření po celém světě v důsledku mezinárodní migrace (Kohne, 2011).

Hemoglobinopatie lze rozdělit na dvě hlavní skupiny, a to na talasemické poruchy a onemocnění v důsledku výskytu abnormálního hemoglobinu. Obě varianty hemoglobinopatií jsou způsobeny mutacemi nebo delecemi v genech kódujících α a β globinové řetězce HGB. U talasemických poruch defekty v těchto genech způsobují poruchu v syntéze HGB, avšak struktura není pozměněna. U talasémie dochází ke snížení nebo úplné ztrátě schopnosti syntézy globinových řetězců. Poté se vyskytuje kvantitativní nerovnováha mezi α a β globinovými řetězci. To má za následek neúčinnou erytropoézu a zvýšenou hemolýzu vedoucí k mikrocytární anémii (Parums, 2024). Pokud dojde k delecí genu v lokusu pro α -globinový řetězec jedná se o onemocnění α -talasémie. Pokud nastane mutace genu v lokusu pro β -globinový řetězec dojde ke vzniku onemocnění β -talasémie (Utsugisawa et al., 2022). U onemocnění způsobených výskytem abnormálního HGB, dochází ke změně ve struktuře HGB v důsledku chybných genů (Kohne, 2011). Tyto strukturální změny způsobují onemocnění jako je srpkovitá anémie, hemolytická anémie, erytrocytózu nebo polycytémii (Harteveld et al., 2022). Právě srpkovitou anémií se bude práce dále podrobněji zabývat.

2 Srpkovitá anémie

Srpkovitá anémie je život ohrožující onemocnění způsobené genetickou mutací HGB, které se charakteristicky projevuje chronickou hemolytickou anémií, bolestivými vazookluzivními krizemi a progresivním poškozením orgánů (Allali et al., 2020). Toto onemocnění poprvé popsal v roce 1910 americký lékař James Bryan Herrick (Ashorobi et al., 2022). A v roce 2006 bylo Světovou zdravotnickou organizací (WHO) uznáno jako globální zdravotnický problém (Isaac et al., 2020).

Jedná se o autozomálně recesivní onemocnění, způsobené bodovou mutací (Tisdale et al., 2020). A to konkrétně v genu kódující β -globinový řetězec (HBB). Dochází poté k tomu, že adenin je substituován thyminem v 6. Kodonu tohoto genu. V důsledku této substituce poté dojde k záměně aminokyselin, kdy hydrofilní kyselina glutamová je nahrazena hydrofobním valinem. Srpkovitá anémie je charakterizována přítomností abnormálního hemoglobinu, a to hemoglobinu S (Wjdan et al., 2021).

2.1 Hemoglobin S

Jedná se o hemoglobin abnormálního typu u srpkovité anémie (HbS). HbS je jedinou variantou hemoglobinu, u které dochází k polymerizaci, když se nachází v deoxygenované formě, tedy i nízký tlak kyslíku vede ke zvýšené polymerizaci a navíc má sníženou afinitu ke kyslíku ve srovnání s ostatními typy HGB (Kato et al., 2018). V deoxygenovaném stavu je valin vystaven na povrch molekuly HbS a velmi snadno se připojuje k β -globinovému řetězci sousední molekuly HbS. Při vyšší koncentraci molekul HbS, které se nachází v deoxygenovaném stavu dostatečně dlouho dochází k jejich polymerizaci do dlouhého řetězce, to má za následek deformaci erytrocytů do srpkovitého tvaru. V důsledku této změny dochází k poškození buněčné membrány, čímž se spouští proces patologických změn, které vedou k mnoha klinickým komplikacím srpkovité anémie (Glaros et al., 2021).

V srpkovitých erytrocytech jsou zvýšené hladiny 2,3-difosfoglycerátu, jedná se o glykolytický meziprodukt. Ten stabilizuje T – stav a podporuje uvolňování kyslíku. V těchto erytrocytech je také zvýšená aktivita enzymu sfingosinkinázy, ten je aktivován vysokými hladinami plazmatického adenosinu. Adenosin vzniká rozkladem adenosinových nukleotidů uvolňovaných z erytrocytů během hemolýzy. Zvýšená aktivita sfingosinkinázy způsobuje nárůst hladiny sfingosin-1-fosfátu, což přispívá ke snížení afinity HbS ke kyslíku. Tato snížená afinita podporuje polymeraci HbS v deoxygenovaném prostředí. Dochází k tomu,

že se HbS nachází v napjaté T konformaci, ve které snadněji polymeruje a dochází k tvorbě polymerních agregátů HbS (Kato et al., 2018).

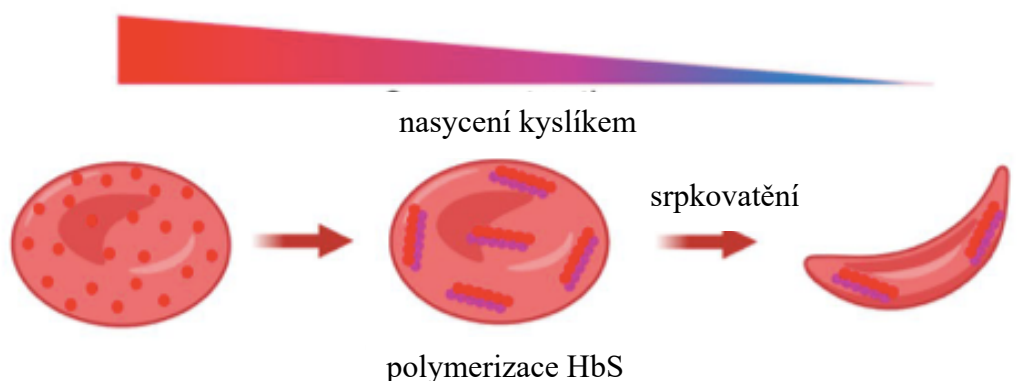
Zároveň substituce aminokyselin v beta globinovém řetězci způsobuje to, že při deoxygenaci je rozpustnost HbS snížena. Taktéž bylo zjištěno, že v oxygenované formě HbS nereaguje a nedochází k jeho polymerizaci. Pokud dojde k nahromadění velkého množství polymeru HbS, vede to k poškození erytrocytů, kdy toto poškození se promítá do fenotypu jako srpkovitá anémie (Eaton, 2020).

2.2 Srpkovité erytrocyty

Při srpkovité anémii se erytrocyty vyznačují pro ně typickým srpkovitým tvarem. Srpkovité erytrocyty jsou rigidní, dehydratované a křehké, což vede k jejich zvýšené destrukci. Jejich struktura má sníženou deformovatelnost, čímž dochází ke snížené schopnosti procházet cévami (Eaton, 2020).

Polymerace HbS způsobuje změny v lipidové dvojvrstvě, membránových receptorů erytrocytů a k dysfunkčnosti některých iontových membránových kanálů. To má za následek sníženou buněčnou hydrataci, zvýšenou hemolýzu a abnormální interakci s jinými buňkami. U srpkovitých erytrocytů je fosfatidylerin, který se u fyziologických erytrocytů nachází ve vnitřní vrstvě buněčné membrány, exponován na povrch buňky. Tento jev přispívá k interakci mezi erytrocyty, leukocyty, trombocyty a aktivaci koagulačních drah (Kato et al., 2018).

Průměrná doba přežití srpkovitých erytrocytů se pohybuje okolo 16 dní, tedy dochází k výraznému snížení oproti fyziologickým 120 dní. Takto abnormální erytrocyty se klinicky projevují hemolytickou anémií (Sundd et al., 2019). Jelikož erytropoéza má nižší tempo, než jaké je tempo destrukce červených krvinek, dochází k intenzivní intravaskulární hemolýze, což vede ke zvýšené hladině HGB a hemu v plazmě, ve které se akumulují. V důsledku čehož se zvyšuje produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) zvyšující oxidační stres a taktéž dochází ke snížené biologické dostupnosti oxidu dusnatého (Nader et al., 2020). Právě abnormální tvar a oxidační poškození červených krvinek způsobuje jejich zvýšené vychytávání a destrukci slezinou (Dhaliwal et al., 2004). Na obrázku č. 2 lze vidět vznik srpkovitých erytrocytů v důsledku polymerizace HbS.



Obrázek 2: **Srpkovité erythrocyty**. HbS – hemoglobin abnormálního typu u srpkovité anémie. Upraveno dle (Conway et al., 2022).

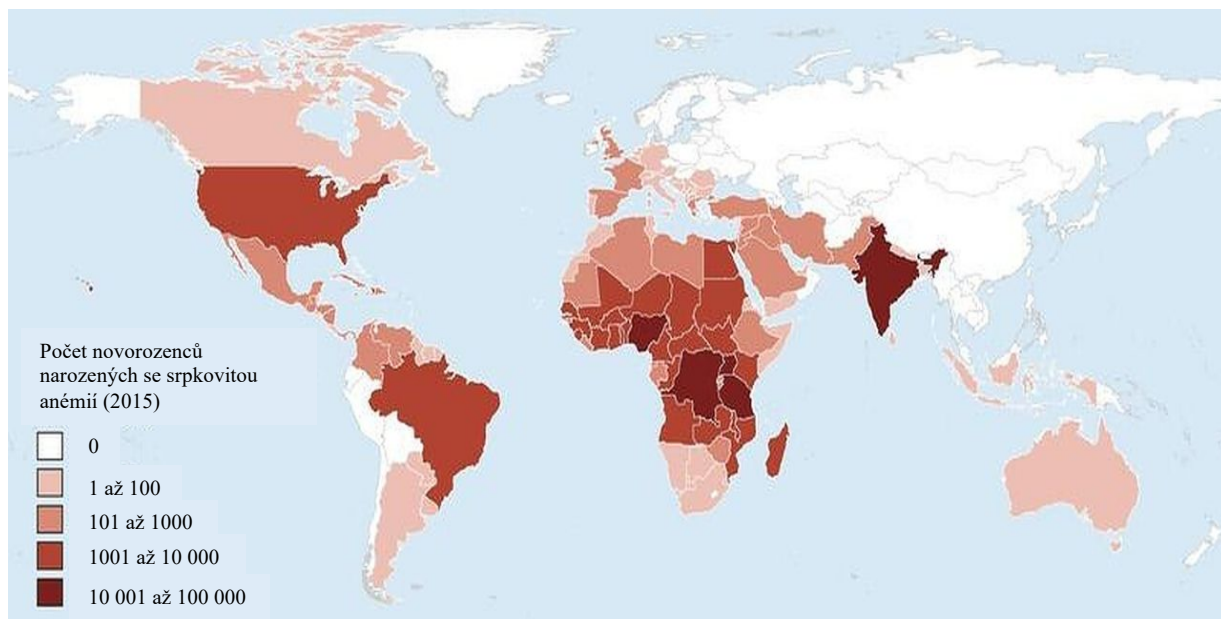
2.3 Výskyt srpkovité anémie

Asi 7 % světové populace jsou nositeli genu pro globinovou mutaci, kdy nejvíce frekventovaný a zároveň nejvíce patogenní je právě gen pro srpkovitou anémii (Odame et al., 2020). Odhaduje se, že na světě trpí srpkovitou anémií přibližně 300 milionů lidí, a to jak homozygotní, tak i heterozygotní formou, kdy jedna třetina z tohoto počtu jsou lidé žijící v oblasti subsaharské Afriky (Ashorobi et al., 2022). Ročně se narodí více než 300 000 dětí s homozygotní formou, kdy dvě třetiny z těchto případů se nachází v Africe. Očekává se, že do roku 2050 by toto číslo mohlo vzrůst až na 400 000 případů ročně (Odame et al., 2020). Výskyt tohoto onemocnění je vyšší v oblastech, ve kterých je endemický výskyt malárie. Tyto oblasti se vyznačují vyšší prevalencí, srpkovitěho znaku, kdy jedinec je nositelem jedné kopie mutovaného genu, díky jeho ochrannému účinku proti malárii (Elendu et al., 2023). Mezi další oblasti s vysokým výskytem patří Indie a Arabský poloostrov (Odame et al., 2020). Míra prevalence srpkovité anémie ve Spojených státech amerických je 9 % mezi Afroameričany, což odpovídá asi třem milionům obyvatel a 0,2% mezi bělošským obyvatelstvem (Ashorobi et al., 2022)

Polovina celosvětové zátěže tohoto onemocnění připadá na tři země a to Nigérii, Republiku Kongo a Indii. Navíc je k tomu v rozvojových zemích početnost onemocnění umocněna tím, že zde chybí kvalitní zdravotnická infrastruktura a je zde vysoký výskyt infekčních onemocnění jako je malárie, virus lidské imunodeficiency (HIV), či invazivní pneumokokové infekce. Tyto skutečnosti se pojí s vyšším rizikem úmrtí obzvláště dětských pacientů (Odame, 2023).

V rozvojových zemích, a to zejména v oblastech subsaharské Afriky se odhaduje, že pouze polovina narozených dětí s tímto onemocněním bude žít déle než 5 let. Ve vyspělých

zemích se předpokládá, že více než 94 % novorozenců se srpkovitou anémií se dožije dospělosti. Takto velký rozdíl ve věku dožití lze přisuzovat zejména novorozeneckému screeningu a komplexní kvalitní zdravotnické péči včetně penicilinové profylaxe a očkování proti pneumokokům (Odame et al., 2020). Na obrázku č. 3 je mapa světa, na které lze vidět početnost dětí narozených se srpkovitou anémií v jednotlivých zemích. Údaje pochází z roku 2015.



Obrázek 3: Počet dětí narozených se srpkovitou anémií ve světě. Upraveno dle (Odame, 2023).

3 Komplikace způsobené srpkovitou anémií

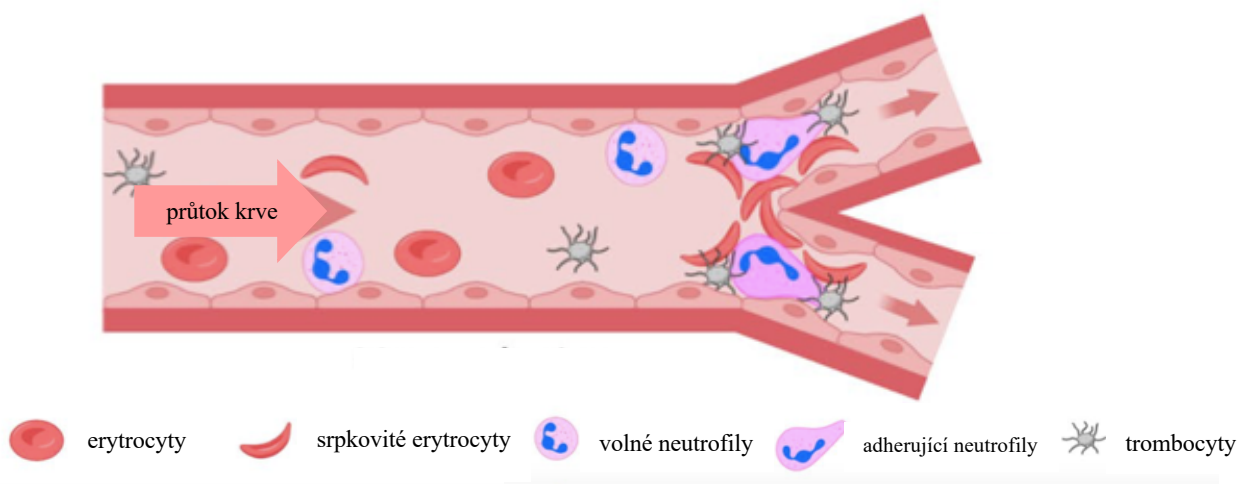
V důsledku srpkovitých erytrocytů dochází k intravaskulární okluzi a chronické hemolytické anémii, které přináší celou řadu akutních i chronických komplikací. Mezi časté akutní komplikace lze zařadit akutní hrudní syndrom, mrtvici, akutní hepatitidu a akutní cholecystitidu. Chronické komplikace, které se vyskytují při srpkovité anémii jsou onemocnění ledvin, cholelitiáza, virová hepatitida, plicní hypertenze, avaskulární nekróza a trombóza (Samuel et al., 2023).

Většina zdravotních komplikací způsobených v důsledku srpkovité anémie se začne projevovat v prvních dvou letech života. A to z toho důvodu, že v erytrocytech začíná fyziologicky ubývat množství HbF a začíná být zcela nahrazován HbA, který je ale v takovém případě HbS. HbF totiž značně intracelulárně inhibuje polymeraci HbS, a tedy se jeho ochranné účinky postnatálně značně snižují (McGann et al., 2015).

3.1 Vazookluze

V důsledku srpkovitého tvaru mají erythrocyty zhoršenou reologii a nemohou hladce procházet krevním řečištěm. Takovéto erythrocyty adherují k vaskulárnímu endotelu a postupně agregují. Agregace vyvolá mikrovaskulární okluzi prostřednictvím interakce s aktivovanými neutrofily a krevními destičkami. Dochází k tomu, že se tvoří mechanická obstrukce tkáně a snižuje se průtok krve. To představuje značný problém zejména u menších cév. Tento jev způsobuje lokální hypoxii a ischemii tkáně, a to i u životně důležitých orgánů. Projevuje se akutními bolestivými krizemi, které mohou přecházet až do chronicity, jedná se o jeden z hlavních rysů a komplikací srpkovité anémie (Odame, 2023). Jelikož v důsledku vazookluze dochází ke sníženému průtoku krve indukuje se delší doba průchodu erythrocytů vaskulárním prostředím s nízkým obsahem kyslíku. Tato skutečnost podporuje polymeraci HbS a poskytuje dostatečný čas k tomu, aby erythrocyty zdeformovaly do srpkovitého tvaru (Nader et al., 2020).

Tyto bolestivé krize jsou v prvních šesti měsících života ojedinělé a dochází ke zvýšení jejich frekvence až s přibývajícím věkem v důsledku snižování hladiny HbF. Při těchto bolestivých krizích je často nutnost podání silných analgetik včetně opioidů, s čím se pojí riziko vzniku závislosti. Jelikož dochází k aktivaci krevních destiček je srpkovitá anémie spojována s hyperkoagulačními stavy, čímž vzniká zvýšené riziko venózních a arteriálních trombotických příhod. U pacientů, kteří již prodělali trombotickou příhodu, se doporučuje doživotní podávání antikoagulačních přípravků, aby se předcházelo opakovaným trombotickým příhodám (Williams et al., 2018). Na obrázku č. 4 je znázorněn proces vazookluze.



Obrázek 4: **Proces vazookluze.** Upraveno dle (Bhalla et al., 2023).

3.2 Chronická hemolytická anémie

V důsledku zvýšené intravaskulární hemolýzy, což je proces rozpadu červených krvinek uvnitř cév, dochází k hromadění uvolněného HGB a hemu v plazmě, které působí jako oxidanty. To má za následek sníženou biologickou dostupnost oxidu dusnatého a zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku (ROS). HbS má vyšší rychlost autooxidace než HbA. Při oxidaci HbS dochází k produkci methemoglobinu, superoxidu a denaturovaného globinu. Superoxid poté může dále generovat peroxid vodíku, kyslík a hydroxylové radikály. Z toho tedy vyplývá, že srpkovité erythrocyty se pohybují v neustálém cyklu oxidačního stresu (Sadaf et al., 2020).

Volný HGB vyskytující se v plazmě ničí NO až tisíckrát rychleji než HGB vázaný ve struktuře erythrocytů. Hemolýza také způsobuje uvolnění arginázy, enzymu, který je přítomný v erythrocytech. Ten hydrolyzuje arginin, který je prekurzorem pro tvorbu NO. NO má klíčovou roli ve fyziologické vazodilataci svým působením na hladké buňky cév. Nedostupnost NO vede k vaskulární dysfunkci. Jeho další funkcí je inhibice aktivace krevních destiček, čímž snižuje riziko tvorby krevních sraženin (Nader et al., 2020). Volný denaturovaný HbS může reagovat s peroxidem vodíku přes Fentonovu reakci za vzniku hydroxylových volných radikálů. Ty jsou vysoce toxické a reaktivní, stávají se hlavním zdrojem oxidačního stresu. Navíc toto oxidační prostředí přispívá k vychytávání NO, čímž dále negativně ovlivňuje vaskulární systém. Nadměrná produkce ROS prostřednictvím peroxidace lipidové vrstvy membrány vede k poškození endotelu, podporuje vaskulární zánět a aktivaci endotelu. Tyto mechanismy se také podílí na vzniku vazookluze. V obou případech se jedná o neenzymatický vznik reaktivních forem kyslíku. Reaktivní superoxid může vzniknout enzymatickým působením NADPH oxidázy. ROS přispívá k poškození erythrocytární membrány a snižuje schopnost reverzibilní deformace erythrocytů (Sadaf et al., 2020).

4 Srpkovitá anémie z pohledu genetiky

Srpkovitá anémie je onemocnění způsobené jednobodovou mutací v prvním exonu HBB. Jedná se o záměnu jednoho nukleotidu v tripletu guanin-adenin-guanin, kde adenin je zaměněn za thymin. Tato jednobodová mutace má za následek změnu jedné aminokyseliny na šestém kodonu β -globinového řetězce, kde je hydrofilní kyselina glutamová nahrazena hydrofobním valinem. Tato choroba se může dědit homozygotně nebo heterozygotně s jinou mutací v HBB (Ceglie et al., 2023).

U srpkovité anémie se můžeme setkat s různými genotypy, jelikož onemocnění je způsobeno kombinací dvou alel genu kódující β -globinový řetězec, kdy alespoň jedna z nich musí nést mutaci. Lze definovat tři základní formy genotypů, které se poté od sebe liší klinickým obrazem. Přestože se jedná o monogenní poruchu, klinické fenotypy tohoto onemocnění jsou extrémně variabilní. Prvním typem je homozygotní HbS/HbS, při této mutaci má jedinec dvě identické alely pro daný gen, zděděné od obou rodičů. Vyskytuje se přibližně u 70 % případů srpkovité anémie a jedná se o její nejzávažnější formu. U následujících variant se jedná o heterozygotní mutaci. V těchto případech se společně s jednou mutací v HBB dědí navíc jeden další mutovaný gen. První z nich je varianta HbS/hemoglobin C, ten se vyskytuje u 25 % případů a nejvíce z nich se nachází v západní Africe (Hardouin et al., 2023). Celkově se jedná o druhou nejčastější formu srpkovité anémie. Hemoglobin C je způsoben substitucí aminokyseliny glutaminu za lysin na 6. pozici v β -globinovém řetězci. Tato forma se projevuje ve fenotypu mírněji než HbS/HbS (Dimitrievska et al., 2024). Druhým typem je současná dědičnost s β -talasémií, to vede k srpkovitému β -talasémii genotypu HbS/ β -talasémie. Jedná se o nejzávažnější formu a nalezneme ji pouze u 5 % případů (Hardouin et al., 2023). U srpkovité β -talasémie můžeme dále rozlišit dvě formy. A to formu HbS/ β plus talasémie (HbS/ β +), u které dochází ke snížené produkci β -globinů. Zatímco u druhé formy HbS/ β nula talasémie (HbS/ β 0) vůbec nedochází k syntéze β -globinů (Arishi et al., 2021). U jedinců s genotypem HbS/ β 0 je průběh onemocnění závažnější a ve většině případů se fenotypově projevuje jako homozygotní forma HbS/HbS. Pacienti, kteří zdělili genotyp HbS/ β + se ve fenotypu projevují variabilně od mírných až po těžké formy (Inusa et al., 2019). Heterozygotní jedinci s genotypem HbA/HbS jsou zdravými přenašeči tohoto onemocnění, kteří nesou jak alelu se zdravým genem, tak i alelu s abnormálním recesivním genem. U většiny těchto jedinců se v průběhu života nevyskytují žádné typické příznaky pro srpkovitou anémii, jelikož je přítomnost zdravé alely schopna defekt vykompenzovat (Hardouin et al., 2023).

5 Diagnostika a novorozenecký screening

Ve vyspělých zemích je délka života pacientů se srpkovitou anémií vyšší, a to hlavně díky včasné diagnóze následovanou kvalitní komplexní lékařskou péčí. Pomocí prekoncepčního screeningu lze identifikovat rodiče, jejichž potenciální potomci by mohli být ohroženi srpkovitou anémií. Párům, jejichž výsledky testu jsou pozitivní bývá následovně nabídnuta prenatální diagnostika. Jedná se o relativně bezpečný, ale invazivní zákrok. Provádí se během 9. týdne těhotenství, kdy z choriových klků jsou odebrány vzorky

fetální DNA (Kato et al., 2018). Novorozenecký screening umožňuje včasnou identifikaci nemoci a díky tomu může být zajištěno, že dítěti bude ihned po narození poskytnuta potřebná zdravotnická péče. Většina zdravotnických programů zahrnuje novorozenecký screening již v prvním týdnu po narození dítěte. V tomto období je exprese HbA, a tedy i toho potenciálně abnormálního stále nízká. To představuje problém, jelikož citlivost testů je kvůli tomuto faktu snížena. Z tohoto důvodu se klade čím dál větší důraz na využití diagnostiky DNA, při níž se využívají metody polymerázové řetězové reakce (PCR) a sekvenční analýzy. Tyto genetické testy jsou ale finančně náročné a vyžadují, aby byly prováděny vysoce kvalifikovaným personálem. Dále přesné výsledky přináší využití tandemové hmotnostní spektrofotometrie (Williams et al., 2018).

K detekci srpkovité anémie se využívají screeningové testy, mezi které řadíme kompletní krevní obraz, periferní nátěr krve a srpkovitý test. Následně se provádí konfirmační testy založené na separaci HGB. Tyto laboratorní metody pracují na principu, kdy se určí, jaký typ HGB se v červených krvinkách nachází. Dochází k separaci HGB na základě rozdílnosti v jejich proteinové struktuře a elektrického náboje. Mezi standardně používané metody patří hemoglobinová elektroforéza, izoelektrická fokusace, kapilární elektroforéza, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a hmotnostní spektroskopie. Pomocí těchto metod je tedy možno určit jaký typ HGB se v červených krvinkách nachází. Ale nelze pomocí nich určit, genotyp HGB, který daný jedinec zdědil. Jako základní a spolehlivý standart v diagnostice srpkovité anémie se uvádí kompletní krevní obraz, hemoglobinová elektroforéza a HPLC (Odame, 2023).

5.1 Kompletní krevní obraz

Jedná se o primární screeningový test, který slouží k rozlišení a charakterizaci jednotlivých typů anémie. Mutace HGB tedy ovlivňuje i jednotlivé hematologické parametry. Zejména u homozygotních pacientů a pacientů s formou HbS β 0, u kterých se typicky vyskytuje hemolytická anémie, nalézáme snížené hodnoty celkového počtu erytrocytů, HGB a hematokritu. Naopak počty leukocytů a trombocytů bývají zvýšené (Buhari et al., 2023). Počty retikulocytů bývají různé a jsou silně ovlivněny individuálními faktory, jako je stupeň anémie a odpověď kostní dřeně na ni u daného jedince. Bývá zvýšená šířka distribuce červených krvinek, kvůli různým subpopulacím erytrocytů, které se u pacientů vyskytují. Ačkoliv krevní obraz přináší cenné informace, neposkytuje kompletní diagnózu (Arishi et al., 2021).

5.2 Nátěr periferní krve

Nátěr periferní krve následuje většinou poté, co byly v automatizačních počtech zjištěny určité abnormality. Slouží ke zkoumání mikroskopických změn v morfologii krevních buněk, což může posloužit k získání podrobnějších informací v diagnostice onemocnění (Buhari et al., 2023).

5.3 Srpkovité testy rozpustnosti

Princip tohoto testu rozpustnosti je, že HbS ve svém deoxygenovaném stavu není rozpustný v koncentrovaném fosfátovém pufru v přítomnosti hemolyzačního činidla dithionátu sodného. Ten způsobuje lýzi erytrocytů, ze kterých se uvolňuje HGB. HbA se snadno rozpouští a roztok se zbarví do červena, ale zůstává čirý. Naproti tomu HbS se nerozpouští a dochází k zakalení roztoku, jelikož HbS se sráží ve formě malých krystalků, které vytváří tento zákal. Výsledky se porovnávají s negativní a pozitivní kontrolou. Tento test je levný a snadno proveditelný, avšak je zatížen chybovostí, která ztěžuje jeho použití ve screeningových programech. U novorozeneckého screeningu se vyskytuje poměrně velké procento falešně negativních výsledků, jelikož se u novorozenců stále nachází vysoké hladiny HbF a nízké hladiny HbS. HbF také snižuje míru deoxygenace HbS. Dále se falešně negativní výsledky nachází u pacientů, u kterých HbS tvoří méně než 10 % z celkového HGB. Na druhou stranu u pacientů s vysokou viskozitou séra, erytrocytózou nebo výraznou leukocytózou byly pozorovány falešně pozitivní výsledky. Taktéž tento test není dostatečně citlivý na to, aby byl schopen detekovat zdravé přenašeče tohoto onemocnění (Nigam et al., 2024).

5.4 Hemoglobinová elektroforéza

Jedná se o chromatografickou techniku, při které se využívá elektrické pole, které zprostředkovává usnadněnou migraci elektricky nabitých molekul. Při elektroforéze lze využít různé varianty médií a pufrů (Arishi et al., 2021).

5.4.1 Alkalická elektroforéza

Alkalická elektroforéza probíhá při alkalickém pH, přesněji při pH 8,4. Nejprve se z erytrocytů vytvoří hemolyzát, který se aplikuje do celulózového proužku a zavádějíciho pufru při konstantním napětí v elektroforetické komoře. Různé typy HBG se poté v důsledku jejich rozdílných nábojů rozdělí do jednotlivých pásů na základě jejich rozdílné pohyblivosti. Tento typ elektroforézy umožňuje spolehlivé rozlišení HbS

a hemoglobinu C. Ale není schopen rozeznat varianty s velmi podobným elektrickým nábojem, které poté migrují společně. Dále bývá ovlivněn vysokými hladinami HbF u novorozenců (Arishi et al., 2021).

5.4.2 Elektroforéza na citrátovém agaru

Elektroforéza na citrátovém agaru se provádí při pH 6-6,2 a principem je interakce mezi agaropektinem v gelové směsi se strukturálními změnami HGB. Většina variant, které společně migrují během alkalické elektroforézy, lze na citrátovém agaru účinně separovat. Zároveň nebývá ovlivňována vyššími hladinami HbF a lze ji tedy spolehlivě využít k diagnostice srpkovité anémie u novorozenců. Bohužel v rozvojových zemích, které jsou zatíženy vysokým výskytem tohoto onemocnění, není tato technika běžně dostupná (Arishi et al., 2021).

5.4.3 Kapilární elektroforéza

Využívá se k diagnostice srpkovité anémie a talasémie, a to na základě oddělení frakcí HGB. Na počátku 21. století se stala tato metoda zcela automatizovanou. Kombinuje dva principy separace, a to elektroforetickou mobilitu v alkalickém pufru a elektroosmotický tok, který vede k velmi efektivní separaci. V přístroji se nachází osm paralelních kapilár zhotovených z taveného oxidu křemičitého, a lze tedy analyzovat několik vzorků zároveň. Na ty se aplikuje vysoké napětí, které zajistí, že molekuly HGB začnou putovat směrem k detektoru. Zjištěné frakce hemoglobinu lze následně kvantifikovat a vytvořit ferogram. Podle migračních zón na ferogramu lze identifikovat typy HGB. Každá kolona je použitelná pro přibližně 3000 analýz. Hemolyzáty erytrocytů, které se používají k detekci, jsou připravovány taktéž automaticky. Touto metodou lze analyzovat i vysušenou kapku krve na filtračním papíře, nebo tekutou pupečnickovou krev. Je tedy vhodná i pro novorozenecký screening a často se v tomto případě využívá jako první možnost volby (Frömmel, 2018).

5.6 Izoelektrická fokusace

U této metody jsou separovány proteiny na základě svých rozdílných izoelektrických bodů. Molekuly HGB putují přes gradient pH, dokud nedosáhnou svých izoelektrických bodů. Pomocí této techniky lze spolehlivě detekovat HbS, a to i ve vzorcích s vysokými hladinami HbF. Také k analýze stačí malé množství vzorku a lze využít i vysušenou kapku krve. Díky těmto výhodám patří mezi využívané diagnostické metody v novorozeneckém screeningu, i přesto, že je poměrně drahá (Arishi et al., 2021).

5.7 Vysokoúčinná plynová chromatografie

U této techniky dochází k tomu, že jsou frakce HGB od sebe separovány na základě jejich rozdílné interakce se stacionární fází. Následně dochází k jejich detekci dle retenčních časů a tvarů píku, metoda je jak detekční, tak i kvantifikační. Každá varianta HGB má tedy specifický retenční čas, který se poté porovnává se standardními retenčními časy frakcí HGB. HPLC vykazuje vyšší citlivost při separaci než elektroforéza. Taktéž je spolehlivou metodou pro monitorování pacientů, kteří podstupují léčbu pomocí krevních transfuzí a hydroxymočovinou (Frömmel, 2018).

5.8 Techniky založené na polymerázové řetězové reakci

Jedná se o jednu z nejefektivnějších diagnostických metod, která zásadně ovlivnila prenatalní a neonatální screening. Tato technika umožňuje mnohonásobné zvýšení počtu kopií specifické DNA sekvence za použití speciálních enzymů a primerů. Díky metodě PCR lze detekovat a analyzovat jednotlivé geny nebo vícero genů i v případě, kdy jsou v původním vzorku málo zastoupeny. Proces PCR zahrnuje 20-40 tepelných cyklů, která se opakují a zahrnují denaturaci, žíhání a prodlužování DNA. Výsledek PCR lze detekovat například pomocí gelové elektroforézy, sekvenování, analýzy křivky tání nebo sledováním změny fluorescence. Konkrétní technika založená na PCR je analýza tání s vysokým rozlišením, což je metoda jednoduchá, citlivá a nákladově efektivní pro použití hromadného screeningu genotypu srpkovité anémie (Arishi et al., 2021).

6 Terapie srpkovité anémie

6.1 Genová terapie

Genová terapie je cílená na autologní hematopoetické kmenové buňky (HSC) a poskytuje vyléčení. Doposud byla jedinou kurativní léčbou transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT) zejména od shodného příbuzenského dárce. HSC se nachází převážně v kostní dřeni. Jedná se o multipotentní buňky, které jsou schopny diferenciaci na jakýkoliv typ krevních buněk. Jsou zodpovědné za krvetvorbu po celý život člověka. Exprimují na svůj povrch CD34 znak, který se používá k jejich identifikaci. Během autologní genové terapie dochází k tomu, že se do vlastních buněk pacienta přidává kopie zdravého genu, nebo je mutovaný gen opraven či inaktivován (Germino-Watnick et al., 2022).

Genová terapie byla dlouhodobě sledována jako potenciální léčba srpkovité anémie. Pokroky uskutečněné v genomovém sekvenování a objevy způsobů, jak lze modifikovat genom HSC umožnily aplikaci genové terapie i na toto onemocnění. Před samotnou klinickou aplikací bylo potřeba vyřešit několik otázek jako shromáždění dostatečného množství kmenových buněk pacienta pro genovou modifikaci a zvýšení exprese přenesených genů na terapeutickou úroveň. A také jak zajistit, aby u pacientů proběhlo adekvátní přihojení genově modifikovaných buněk. V současné době se k terapii srpkovité anémie používají dvě obecné metody. První je přidání genu, ty jsou přenášeny do genomu pacienta pomocí vektorového systému. Druhou je úprava genu, při kterém se provádí trvalé genomové změny, což zahrnuje odstranění nebo nahrazení určité DNA sekvence (Abraham et al., 2021). Při editaci genu se využívají tzv. endonukleázy. Jedná se o proteiny, které rozštěpí určitou oblast DNA uvnitř jejího řetězce. Poté se mohou spojit tyto rozříznuté konce, nebo se zde vloží nová či upravená genová sekvence (Parums, 2024). Jelikož se jedná o autologní transplantaci, buňky použité na transplantaci pochází od samotného pacienta, je proto použitelná pro všechny pacienty bez ohledu na dostupnost vhodného dárce. Tím pádem nehrozí nebezpečí reakce štěpu proti hostiteli ani riziko odmítnutí štěpu. Z tohoto důvodu je na vzestupu snaha co nejvíce využívat genovou terapii, která je možná pro všechny pacienty. Americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schválil 8. 12. 2023 dvě nové genové terapie pro léčbu srpkovité anémie, konkrétně metodu, která využívá segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetitiv (CRISPR) a metodu Lovo-cel. Byly schváleny pro pacienty starší dvanácti let s anamnézou vazookluzivních krizí. K tomuto velkému kroku došlo po více než deseti letech od objevení metody CRISPR. Metoda CRISPR využívá jako endonukleázy proteiny asociované s CRISPR (Cas protein). Zkráceně, tyto metody pracují na principu extrakce, genetické modifikace a následné reinfuze vlastních HSC pacienta. Obě se během studií ukázaly jako účinné a u více než 90 % pacientů vedly k úplnému odstranění vazookluzivních krizí. Bohužel ale ani genová terapie nemůže vést ke zvrácení poškození orgánů, které bylo již v důsledku tohoto onemocnění způsobeno před zahájením terapie (The Lancet, 2023). Technologií CRISPR se práce bude podrobněji zabývat v následujících podkapitolách.

Pro genetickou modifikaci HSC k léčbě srpkovité anémie je nezbytné pečlivě optimalizovat každý krok, aby bylo dosaženo celkového úspěchu. Klíčovými složkami jsou informovaný souhlas pacienta, izolace HSC pro genetickou manipulaci *in vitro* a kondicionování kostní dřeně. U srpkovité anémie, stejně jako u mnoho dalších závažných onemocnění, mají pacienti obtíže s porozuměním složitých léčebných postupů, což komplikuje

jejich schopnost poskytnout informovaný souhlas. Proto se výzkumníci stále více snaží naplnit vzdělávací potřeby pacientů s tímto onemocněním a jejich rodinných příslušníků, kteří zvažují léčebnou terapii. Pro izolaci HSC určených ke klinické aplikaci se HSC mobilizují do krevního oběhu pomocí faktoru stimulující kolonie granulocytů (G-CSF). Nicméně podání tohoto stimulujícího faktoru pacientům trpící srpkovitou anémií se pojí s vážnými komplikacemi a bylo by v důsledku kontraproduktivní. Proto se alternativně využívá plerixafor, který napomáhá uvolňovat HSC z kostní dřeně do krevního oběhu. Po mobilizaci následuje odběr aferézou a imunogenetické obohacení o povrchový antigen CD34+. Podle protokolů pro HSCT je potřeba provést infuzi alespoň 2×10^6 modifikovaných buněk na kilogram hmotnosti, ale kvůli ztrátám při genetické manipulaci je obvykle zapotřebí odebrat alespoň pětinasobné množství buněk, a to i s ohledem na uchování záložních nemodifikovaných HSC. Proto je většinou zapotřebí více kol mobilizace a odběru HSC. Nakonec je důležité očistit hematopoetické prostředí, ve kterém se budou transplantované geneticky upravené HSC nacházet, kvůli jejich správnému přihojení. K tomu se využívají myelotoxické látky, především busulfan. Ten ale přináší riziko orgánového poškození v důsledku své toxicity. Pacienti se srpkovitou anémií, u kterých se již projevilo chronické orgánové poškození v důsledku nemoci, jsou citlivější na toxicitu busulfanu, a nejsou proto vhodní k tomuto typu terapie. Je kladen velký důraz na výzkum nových látek s nižší toxicitou, které by připravily kostní dřeň na transplantaci (Crossley et al., 2022).

6.1.1 Metoda CRISPR

Jedná se o techniku genetického inženýrství, kterou lze pomocí editace genu modifikovat genom živých organismů. Je založena na verzi bakteriálního CRISPR-Cas antivirového obranného systému, který je součástí adaptivní imunity archeí a prokaryot (Parums, 2024).

Historie úprav genomu sahá až do sedmdesátých let 20. století, ale v té době ještě nebyli vědci schopni cíleně vložit úseky DNA do genomu buněk. V rané fázi genové editace se využívala technologie homologní rekombinace, která umožňovala výměnu genetických sekvencí mezi dvěma DNA s podobnými úseky. Avšak tato metoda nebyla příliš efektivní a měla velkou náchylnost k chybám. Později byly vyvinuty modifikované nukleázy, které umožňovaly vytvoření dvouřetězcových zlomů (DBS) DNA na přesně určeném místě v genomu s jeho následnou úpravou (Zhu, 2022). Prvním genovým zaměřovacím systémem, byla v roce 2005 technika využívající nukleázy se zinkovým prstem (ZFN), která dokáže rozpoznat specifické sekvence DNA, čímž může být provedena v genomu cílená inzerce.

Tuto technologii následovala v roce 2010 metoda využívající efektorové nukleázy podobné aktivátorům transkripce (TALEN). Nicméně v roce 2012 přišla technologie CRISPR-protein 9 asociovaný s CRISPR (CRISPR-Cas9), která se ukázala jako ta s nejeftivnější konstrukcí. To vedlo ke snaze uvést ji co nejrychleji do praxe. Existuje několik různých systémů CRISPR-Cas, které jsou rozděleny do šesti typů. Tyto typy jsou seskupeny do dvou hlavních tříd na základě struktury efektorových proteinů Cas. Jednotlivé typy se ještě dále dělí na různé podtypy, v dnešní době je známo více než dvacet podtypů (Kozovska et al., 2021). Typy patřící do první třídy pracují s vícepodjednotkovými efektorovými komplexy, které se skládají ze čtyř až sedmi Cas proteinů. Druhá třída obsahuje typy, které používají pouze jeden vícedoménovy efektorový protein Cas (Ishino et al., 2018). Typ II, který spadá do druhé třídy, konkrétně CRISPR-Cas9 odvozen ze *Streptococcus pyogenes* je nejlépe prostudovaným a nejvíce využívaným pro účely genového inženýrství zejména díky své jednoduchosti a praktičnosti (Kozovska et al., 2021).

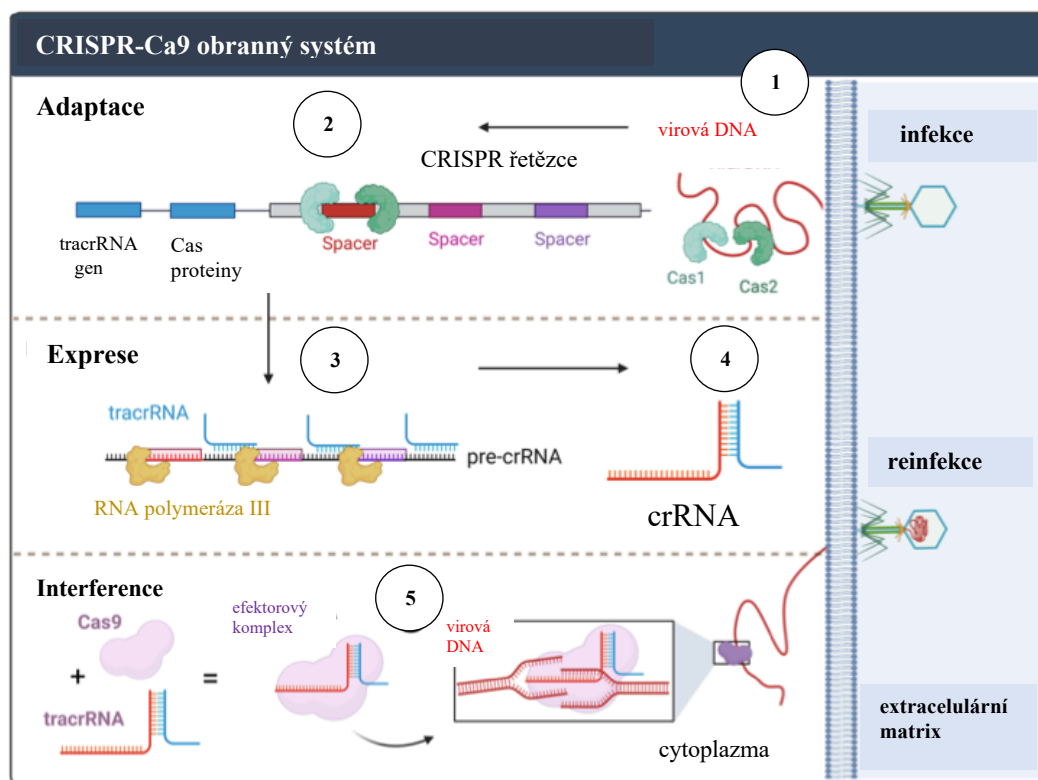
Technologie CRISPR přinesla rapidní změny v oblasti výzkumu a medicíny. Schopnost této metody umožňovat editaci genomu představuje velký potenciál pro léčbu vrozených i získaných onemocnění. Velký zájem budí zejména díky své jednoduchosti, při zaměřování sekvencí DNA v genomu určených k záměně. Nemluví se pouze o možnosti metody CRISPR k léčbě monogenních onemocnění jako je například srpkovitá anémie, β -talasémie nebo Duchennova svalová dystrofie. Ale také o léčbě komplexních heterogenních onemocnění jako je rakovina, HIV či diabetes (Bhokisham et al., 2023). Další potenciál této metody je ve vývoji udržitelných metod na výrobu paliv a chemikálií nebo zlepšování kvality plodin v potravinářském průmyslu (Nidhi et al., 2021).

6.1.1.1 CRISPR-Cas systém u prokaryot

Roku 1987 molekulární biolog Yoshizumi Ishino a jeho tým, zkoumaly genom bakterie *Escherichia coli*. Během této práce objevili, že se v jejím genomu nachází segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetice. Nejprve byly tyto repetice nazývány různými způsoby, až v roce 2002 poprvé Rudd Jansen použil označení CRISPR, které bylo všeobecně přijato. Jedná se o krátké, opakující se sekvence DNA, které jsou stejné, bez ohledu na to, jestli jsou čteny od 5' konce ke 3' konci jednoho řetězce DNA nebo od 3' konci k 5' konci komplementárního řetězce. Jsou obklopeny sekvencemi kódujícími proteiny Cas. Podobné sekvenční vzory poté byly nalezeny přibližně u 40 % bakterií a 90 % archeí. Mezi těmito opakujícími se úseky CRISPR se nachází unikátní sekvence. V dnešní době nazývané jako spacers. Ty jsou bakteriím cizí a přirozeně do jejich genomu nepatří. V té době

nebylo možné určit biologický význam tohoto systému, jelikož ještě neexistovaly dostatečné údaje o sekvencích DNA (Gostimskaya, 2022).

K objasnění skutečné funkce došlo až v polovině 20. století. Bylo zjištěno, že spacerové úseky odpovídají DNA virů a jakékoliv přidání nebo odstranění těchto unikátních sekvencí vedlo ke změně fenotypu fágové rezistence. Původně tyto sekvence patřily bakteriofágům, které bakterie získaly, když jimi byly napadeny. Pomocí CRISPR systému si zapamatují tyto útoky a při opětovném napadení se dokáží proti nim bránit, tedy slouží jako důležitý nástroj jejich imunitní obrany. K tomu využívají proteinový komplex, konkrétně se jedná o protein 1 asociovaný s CRISPR (Cas1) a protein 2 asociovaný s CRISPR (Cas2). Ten rozpozná invazivní virovou DNA a vyřízne z ní segment zvaný protospacer. Tento protospacer je následně inkorporován do bakteriálního genomu mezi jednotlivé CRISPR sekvence a stává se z něj spacer. Tím vzniknou CRISPR řetězce (Ishino et al., 2018). Když Cas komplex vyřezává protospacerové úseky DNA, zaměřuje se na místa, která sousedí se sekvencí N-guanin-guanin (NGG). Zde N zastupuje jakýkoliv nukleotid obsahující libovolnou nukleovou bázi. Tato specifická sekvence se nazývá motiv sousedící s protospacerem (PAM). To znamená, že se Cas komplex naváže na cílovou DNA až po rozpoznání PAM. Tato sekvence se nevyskytuje v bakteriálním genomu, a proto se nemůže systém CRISPR obrátit proti vlastní buňce. Hlavní funkcí PAM sekvence je, že napomáhá rozlišit vlastní DNA od cizí DNA se stejnou sekvencí (Makarova et al., 2020). Bylo zjištěno, že stačí pouze jediná mutace v sekvenci PAM k tomu, aby byl bakteriofág schopen obejít tuto imunitní obranu svého hostitele (Javaid et al., 2022). Při opětovném napadení viru stejného druhu se CRISPR lokusy na nově vytvořeném řetězci transkribují do dlouhého řetězce RNA a vzniká prekurzorová RNA (pre-crRNA) (Ishino et al., 2018). Tento proces je z velké části uskutečněn pomocí další RNA, a to trans-aktivující RNA (tracrRNA), která je komplementární ke CRISPR sekvencím v pre-crRNA. Tyto dvě RNA vytvářejí komplex, který je poté štěpen na menší úseky pomocí RNA polymerázy III, čímž vzniká CRISPR RNA (cr-RNA). Společně s tracrRNA se crRNA váže na endonukleázu Cas. Jejich úkolem je navést endonukleázu Cas na požadované místo. Takto vytvořený komplex následně prochází DNA viru a v případě shody se sekvencí odpovídající crRNA, endonukleáza Cas rozštěpí virovou DNA, čímž znemožní jeho životaschopnost (Li et al., 2020). Na obrázku č. 5 je shrnuto, jak funguje konkrétně obranný systém CRISPR-Cas9 u prokaryot.



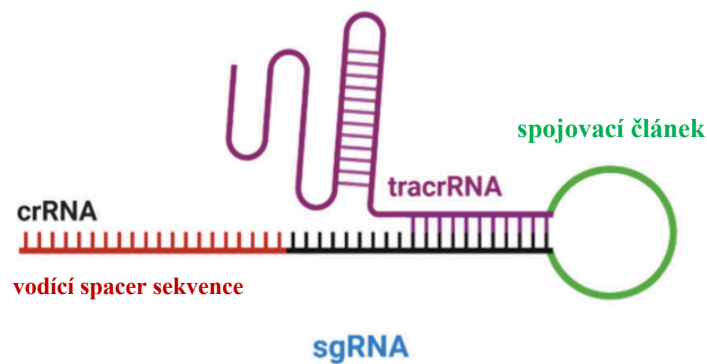
Obrázek 5: **Obranný systém CRISPR-Cas9.** CRISPR – segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetit, CRISPR-Cas9 – CRISPR-protein 9 asociovaný s CRISPR, Cas1 – protein 1 asociovaný s CRISPR, Cas2 – protein 2 asociovaný s CRISPR, Cas – protein asociovaný s CRISPR, tracrRNA – trans-aktivující RNA, pre-crRNA – prekurzorová RNA, crRNA – CRISPR RNA. Upraveno dle (Motoche-Monar et al., 2023).

6.1.1.2 CRISPR-Cas9

V roce 2020 obdržely Jennifer Doudnaová a Emmanuelle Charpentierová Nobelovu cenu za chemii za jejich výzkum metody CRISPR-Cas9 (Parums, 2024). Hlavní rozdíl mezi technologií CRISPR-Cas9 a jejími předchůdci ZFN a TALEN spočívá v tom, že vyžaduje pouze jedinou vodící RNA (sgRNA) o krátké sekvenci, která určuje specifitu pro místo DSB. Navíc zatímco technologie ZFN a TALEN používají k rozpoznání cílového místa uměle vytvořené proteiny, v systému CRISPR-Cas9 je rozpoznání cílové sekvence založeno na interakci RNA a DNA. Tyto faktory přinášejí několik výhod včetně snadného návrhu libovolných genomických cílů, přesnější predikce vedlejších cílů, schopnost modifikovat několik genomových míst současně a menší finanční zátěž (Khalil, 2020).

Při editaci genomu pomocí technologie CRISPR-Cas9 je principem štěpení dvouvláknové DNA v cílené oblasti, a to díky jedinému efektorovému komplexu, složeného ze dvou hlavních komponent. Když tento efektorový komplex rozštěpí cílový gen, dojde k narušení jeho funkce a mohou být provedeny zamýšlené úpravy. Efektorový komplex

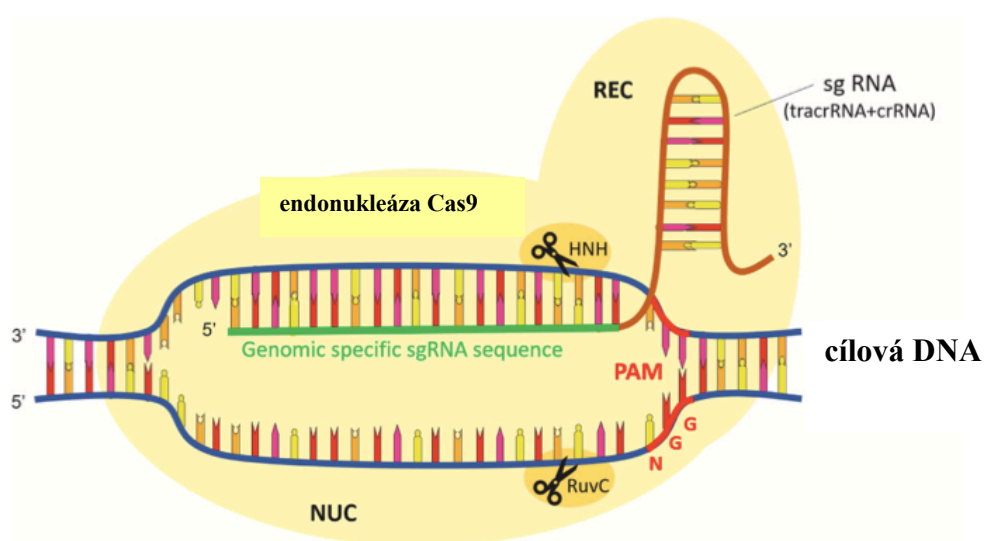
se skládá z sgRNA, která slouží k navádění proteinu Cas9 na cílové místo, zajišťuje přesnost a specifičnost této metody. A DNA endonukleázy Cas9, ta provádí DSB v určené poloze na DNA (Bhokisham et al., 2023). SgRNA se skládá ze sekvenčně specifického cílicího prvku crRNA a tracrRNA, která spojuje dohromady crRNA s proteinem Cas9. Vzhledem k tomu, že crRNA a tracrRNA jsou u prokaryot dvě samostatné molekuly, je nutné, aby pro editaci genomu v eukaryotních buňkách, byly spojeny v jednu samostatnou sgRNA pomocí umělého propojovacího článku. SgRNA rozpoznává cílovou sekvenci na základě standardního Watson-Crickova párování bazí, přičemž crRNA obsahuje sekvenci komplementární k té v cílové DNA. SgRNA bývá naprogramována tak, aby její 5' konec byl komplementární k cílové sekvenci (Ishino et al., 2018). Na obrázku č. 6 je vyobrazena struktura sgRNA.



Obrázek 6: **Struktura sgRNA.** CrRNA – CRISPR RNA, tracrRNA – trans-aktivující RNA, sgRNA – vodící RNA. Upraveno dle (Nidhi et al., 2021).

Protein Cas9 je sám o sobě neaktivní a až po navázání na sgRNA změnou konformace dojde k jeho aktivaci (Zhu, 2022). Má dvouřetězcovou strukturu, která zahrnuje rozpoznávací lalok endonukleázy Cas9 (REC) a nukleázový lalok endonukleázy Cas9 (NUC) (Kozovska et al., 2021). Lalok REC se skládá z dlouhé α šroubovice a dvou funkčních domén, a to rozpoznávací domény 1 a rozpoznávací domény 2. Lalok NUC obsahuje PAM interagující doménu (PI), RuvC nukleázu a nukleázovou doménu s motivem histidin-asparagin-histidin (HNH doména). Doména PI uděluje PAM specifičnost, která je zodpovědná za vazbu s cílovou sekvencí. Nejprve se REC lalok spojí se sgRNA přes rozpoznávací doménu 1, aby identifikoval sekvenci PAM na cílové DNA (Zhu, 2022). Obvykle se používá divoký typ endonukleázy Cas9 odvozený z bakterie *Streptococcus pyogenes*, který má specifickou sekvenci PAM 5'-NGG-3'. Tato sekvence se nachází těsně za cílovou sekvencí v genomové DNA, na tom řetězci, který není cílem crRNA (Khalil, 2020). Poté se může sgRNA spárovat s cílovou DNA a navést zde domény RuvC a HNH laloku NUC k provedení štěpení. Doména HNH štěpí cílové vlákno DNA, ke kterému se naváže crRNA, zatímco doména RuvC štěpí nekomplementární řetězec

(Zhu, 2022). Jejich společnou prací vzniká DSB v DNA. Mohou být vytvořeny mutantní varianty Cas9. Například nickáza Cas9 (nCas9) je mutant štěpící pouze jeden řetězec DNA. Toho je dosaženo mutací v HNH nebo Ruv-C doméně, což vede k inaktivaci jedné z těchto domén. Pro vytvoření nCas9 je nutné nahradit histidinový zbytek alaninem v HNH doméně. Nebo pokud má být inaktivována Ruv-C doména musí být v ní nahrazen zbytek kyseliny asparagové alaninem. Současná mutace obou nukleázových domén vede ke vzniku katalyticky neaktivní deaktivované endonukleázy Cas9 (dCas9), čímž se ruší endonukleázová aktivita (Leonova et al., 2020). Na obrázku č. 7 je zobrazena struktura efektorového komplexu typu CRISPR-Cas9.



Obrázek 7: **Efektorový komplex.** Cas9 – protein 9 asociovaný s CRISPR, REC – rozpoznávací lalok endonukleázy Cas9, crRNA – CRISPR RNA, tracrRNA – trans-aktivující RNA, sgRNA – vodící RNA, HNH – nukleázová doména s motivem histidin-asparagin-histidin, PAM – motiv sousedící s protospacerem, NGG –N-guanin-guanin. Upraveno dle (Kozovska et al., 2021).

I přesto, že systém CRISPR-Cas9 nabízí mnoho výhod oproti jiným technologiím, tak má svá určitá omezení. Jedním z nich je, že endonukleáza Cas9 musí nejprve rozpoznat motiv PAM, teprve potom může provést DSB za touto sekvencí. To znamená, že tato techniku může být použita pouze na sekvence v blízkosti motivu PAM (Fraczek et al., 2018). PAM je specifická sekvence nukleotidů, která je nezbytná pro správné navázání a aktivaci endonukleázy Cas9 a hraje důležitou roli při volbě cílových oblastí pro úpravu genomu (Motoche-Monar et al., 2023). Další nevýhodou je vznik DSB v oblastech mimo zamýšlené cílové místo. Tento nežádoucí jev je obtížné identifikovat a často vyžaduje prozkoumání celého genomu. Důsledkem toho může být nepředvídatelná modifikace genu v mimocílových oblastech, což může vést k nečekaným výsledkům nebo dokonce k mutacím

či chromozomálním změnám. Klíčové pro minimalizaci tohoto nežádoucího jevu bylo porozumění jeho možných příčin (Fraczek et al., 2018).

Když sgRNA rozpoznává svůj cíl na DNA pomocí komplementárního párování bazí, existuje riziko, že určí místo, které je vysoce podobné cílové sekvenci (Zhu, 2022). Na začátku crRNA v sgRNA se nachází krátká sekvence, která má klíčovou úlohu při rozpoznání a navázání cílového místa na DNA. Tato sekvence je nezbytná pro správné navádění endonukleázy Cas9 k místu, kde má proběhnout DSB. Umožňuje spárování s cílovou sekvencí v DNA s vysokou specifičností, což je klíčové pro efektivní a přesnou editaci genomu. Specifičnost se výrazně snižuje, pokud se v sekvenci cílové DNA vyskytují dva nebo více odlišných nukleotidů ve srovnání se sekvencí crRNA. Nesrovnalosti v PAM distálních oblastech, tedy oblastech, které se nacházejí dále od PAM sekvence na cílové DNA, rovněž snižují specifitu. Tyto rozdíly jsou, však lépe tolerovány než ty, které se nacházejí v bezprostřední blízkosti PAM sekvence na cílové DNA (Motoche-Monar et al., 2023).

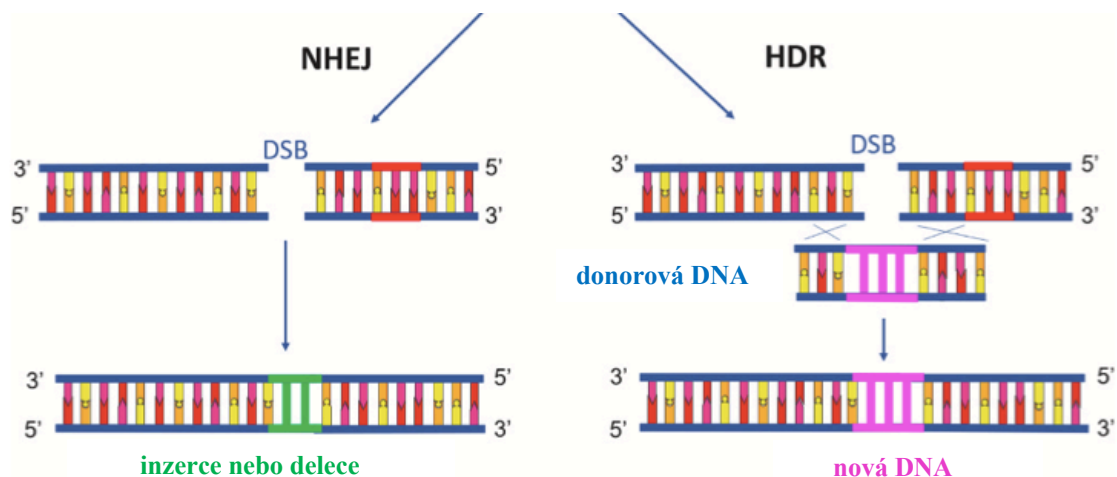
Vazby mimo cíl a jejich následné nepříznivé účinky jsou neodmyslitelnou součástí technologie CRISPR-Cas9. V důsledku toho bylo vyvinuto několik strategií k minimalizaci tohoto jevu. Ty zahrnují různé metodiky včetně modifikace struktury Cas9, pečlivé dávkování Cas9 a sgRNA a úpravy struktury ribonukleotidů sgRNA. Významný pokrok byl dosažen zejména v oblasti úprav ve struktuře ribonukleotidů, což přispělo k vylepšení systému CRISPR-Cas9. Prozkoumány byly metody jako přidání nukleotidů na 5' konci sgRNA pro lepší rozlišení mezi cílovými a mimocílovými místy, prodloužení spojovacího článku mezi tracrRNA a crRNA nebo strategické umístění specifických nukleotidů poblíž PAM sekvence pro zlepšení stability sgRNA (Motoche-Monar et al., 2023).

Jednou z nezbytných podmínek je, že systém CRISPR-Cas9 musí být přítomen v jádře buňky. Problémem je, že ani protein ani nukleové kyseliny nejsou schopny samovolně překonat fyzikálně-chemické bariéry buněk. Proto bylo nutné vynalézt techniky intracelulárního doručení tohoto komplexu (Li et al., 2020).

Existují fyzikální metody, jako jsou mikroinjekce a elektroporace pomocí nichž je efektorový komplex vpraven do jádra buňky. Při mikroinjekci je efektorový komplex injektován přímo do požadovaného místa v buňce, pomocí jehly o průměru 0,5-5 μm . Tento proces probíhá pod mikroskopem, což znemožňuje jeho použití *in vivo*, ale je vhodný pro *in vitro* a *ex vivo* aplikace. Elektroporace využívá pulzní vysokonapěťové elektrické proudy k vytvoření dočasných pórů v buněčné membráně buněk, které jsou suspendovány v pufru. Tyto póry mají velikost několik nanometrů a umožňují vstup komponent o požadovaném

průměru do buněk prostřednictvím hydrodynamiky. Jedná se o nejčastější techniku pro *in vitro* studie. Další možností je dodání systému CRISPR-Cas9 pomocí virových nosičů jako jsou adeno-asociované viry (AAV) nebo lentiviry. Využití AVV poskytuje kontinuální zdroj, protože může být v buňkách trvale jako exogenní DNA nebo může být přímo inkorporován do hostitelského genomu. K vytvoření CRISPR – Cas9 AVV částic se používají, buňky HEK 293T, ty následně infikují cílové buňky stejným způsobem jako přirozené virové částice. Tato metoda je vhodnou, pokud je požadována dlouhodobá exprese určitého genu. Princip dodání systému do buňky je u lentivirových vektorů stejný jako u AVV, avšak výroba lentivirových vektorů je jednodušší. Jsou výbornými nosiči pro využití *in vitro* a *ex vivo*. Nicméně lentivirové vektory přináší určité obtíže jako je jejich náhodná integrace do hostitelského genomu. V blízkosti onkogenů mohou vyvolat jejich aktivaci, což by mohlo vést k rozvoji rakoviny. Existuje také neviróvé dodání prostřednictvím lipidových nanočástic, liposomů a buněčně penetrujících peptidů. Lipidové nanočástice se již dlouho používají k transportu širokého spektra látek do buněk. Protože neobsahují žádné virové složky, mají nižší riziko bezpečnostních problémů a mohou být používány i *in vitro*. Lipofectamin, komerčně dostupná technologie lipidových nanočástic, je lipozomový kationtový preparát, který se naváže na negativně nabitou nukleové kyseliny. Tento komplex se následně váže na negativně nabitou buněčnou membránu a endocytózou je dodány do buňky. Další možností je použití zlatých nanočástic, které jsou chemicky inertní, a tudíž nevyvolávají imunitní odpověď, což je činí vhodnými i pro použití *in vitro* (Javaid et al., 2022).

Zavedení DSB na specifické místo genomu je pouze prvním krokem při jeho editaci. Tato poškození musí být opraveno buněčnými mechanismy opravy DNA, které mohou vést ke změnám v genomové DNA. DSB jsou pro buňky velmi toxické a existují propracované cesty, jak je lze opravit. Selhání v opravě DSB může vést k buněčné smrti (Yang et al., 2020). U eukaryot dominují dvě hlavní cesty opravy, a to nehomologní spojování konců (NHEJ) a homologicky řízená oprava (HDR) (Wilkinson et al., 2019). Mechanismus HDR spočívá v integrování homologních fragmentů DNA do genomu, tato dráha využívá sesterskou chromatidu jako šablonu pro opravu a vytváří požadovaný a přesný produkt úpravy genu. NHEJ je opravný mechanismus, který spojí volné konce DNA zpět dohromady, dochází k uzavření DSB, ale může to vést k náhodným genovým procesům, jako je inserce nebo delece, v místě štěpení. To může vést k narušení funkce genu (Yang et al., 2020). Na obrázku č. 8 jsou zobrazeny cesty NHEJ a HDR, kterými je možné opravit DSB v cílové DNA.



Obrázek 8: **Oprava DSB.** NHEJ – nehomologní spojování konců, HDR – homologicky řízená oprava, DSB – dvouřetězcový zlom. Upraveno dle (Kozovska et al., 2021).

Dráha HDR sice vyžaduje přítomnost homologního templátu DNA, ale na rozdíl od cesty NHEJ, která je náchylná k chybám, opravuje DSB s mnohem větší přesností a spolehlivostí (Nidhi et al., 2021). HDR lze využívat tak, že se uměle vytvoří opravný donorový templát DNA, který je následně integrován do genomu pomocí vektoru k dosažení požadované úpravy vkládáním genu. Tato metoda umožňuje použití exogenní šablony DNA k vytvoření téměř jakékoliv požadované změny DNA, což rozšiřuje její využití, zejména pro bezpečnější klinické aplikace (Zhu, 2022). Přirozená frekvence HDR je však velmi nízká a savčí eukaryotické buňky přednostně využívají dráhu NHEJ před HDR pomocí několika mechanismů. NHEJ je aktivní během celého buněčného cyklu s výjimkou mitózy. Zatímco HDR je aktivní výhradně během S/G2 fáze, kdy je nepoškozená sesterská chromatida, nebo donorová DNA k dispozici. Cesta NHEJ probíhá rychleji než HDR a během buněčného cyklu ji potlačuje prostřednictvím několika mechanismů. Proto by strategie, které manipulují s výběrem cesty opravy a upřednostňují HDR, mohly pomoci k dosažení přesnější editace genomu. Ačkoliv HDR a NHEJ využívají specifické opravné faktory pro své dráhy, tak obě sdílí stejnou signalizační kaskádu, která řídí buněčnou odpověď na Cas9 indukovaný DSB (Yang et al., 2020).

6.1.1.3 Léčba srpkovité anémie pomocí CRISPR-Cas9

V roce 2012 prokázal tým pod vedením Emanuely Charpentierové, že lze pomocí crRNA ve spojení s tracrRNA navádět *ex vivo* endonukleázu Cas9 z bakterie *Streptococcus pyogenes* k cílovým místům DNA, kde mají být provedeny DSB. Později, ve spolupráci

s týmem Jennifer Doudnové dokázaly, že lze tento systém zjednodušit spojením těchto dvou krátkých RNA do jediné sgRNA. Následně několik na sobě nezávislých vědců, modifikovalo tuto technologii pro použití v editaci genomu savčích buněk. To představovalo obrovský pokrok v oblasti genového inženýrství a započala vlna studií zaměřených na využití CRISPR-Cas9 pro editaci genomu v eukaryotních buňkách. První klinická studie u člověka byla zahájena v roce 2016 v Západočínské nemocnici, kde byly imunitní buňky editovány pomocí CRISPR-Cas9 a poté použity k léčbě pacientů s rakovinou plic. V roce 2018 začaly v USA klinické studie zaměřené na využití této technologie k léčbě rakoviny, β -talasémie a srpkovité anémie. V témže stejném roce čínský vědec Che oznámil narození geneticky upravených novorozenců, kteří byli díky editaci genomu pomocí CRISPR technologie odolní vůči nákaze HIV. Výzkumná instituce, ve které Che pracoval, popřela předchozí znalost, nebo schválení jeho výzkumu. Tato událost vyvolala mezinárodní kritiku a rozsáhlou diskusi o etických důsledcích úprav genomu. Naproti tomu všechny klinické studie schváleny FDA byly prováděny v souladu s lékařskými a etickými směrnicemi FDA (Li et al., 2020).

Úspěch genové terapie při léčbě β -talasémie podnítl zahájení studií zaměřených na aplikaci genové terapie u srpkovité anémie. Monogenní povaha tohoto onemocnění a dostupnost HSC byly faktory, které učinily srpkovitou anémii ideálním kandidátem pro léčbu pomocí editace genomu (Ceglie et al., 2023). Výzkum genetické modifikace HSC se zaměřoval na dvě hlavní strategie. První z nich byla vyvolání exprese HbA pomocí korekce bodové mutace a druhou byla indukce tvorby HbF (Demirci et al., 2021). Počáteční přístupy se primárně zaměřovaly na přidání genu pro tvorbu β -globinu nebo γ -globinu. Novější strategie se zaměřují hlavně na reaktivaci exprese HbF (Ceglie et al., 2023).

Výzkumy ukázaly, že přirozeně se vyskytující dědičná perzistence HbF (HPFH), která způsobuje trvale zvýšenou produkci HbF i v dospělosti, zmírňuje patologické projevy spojené se srpkovitou anémií, jelikož HbF inhibuje polymeraci HbS (Ceglie et al., 2023). Jedná se o benigní genetický stav, který může být způsobem malými změnami v genomu, jako je například záměna jediné nukleotidu nebo malé delece. Tyto změny eliminují transkripční represory BCL11A a ZBTB7A. Jedná se o proteiny, které se váží na DNA a potlačují expresi γ -globinu. Odstraněním jejich vazebných motivů se tyto represory nemohou navázat na DNA a γ -globin může být exprimován. Rané klinické studie prokázaly, že potlačení genu represoru γ -globinu BCL11A pomocí technologie CRISPR-Cas9 stimuluje produkci HbF a snižuje morbiditu u pacientů se srpkovitou anémií (Mayuranathan et al., 2023). Z toho důvodu se opětovné probuzení tvorby HbF v dospělých erythrocytech stalo klíčovou terapeutickou

strategií. Metoda CRISPR-Cas9 otevřela cestu k efektivní indukci HbF pomocí vytváření umělých mutací HPFH, úpravou transkripčních tlumičů HbF a modulací prostředníků, kteří ovlivňují expresi HbF (Ceglie et al., 2023).

V rámci konkrétních postupů je oblast DNA obsahující vazebné motivy pro represory γ -globinu rozlomena pomocí CRISPR-Cas9 a následně opravena cestou NHEJ. V potomstvu erytrocytů, které vzniknou z těchto modifikovaných buněk, je pak zvýšena exprese HbF na potenciálně terapeutickou úroveň. Jiný přístup zahrnuje vytvoření nových variant promotoru γ -globinu, které by navodily stav HPFH. Různé záměny v promotorech mohou vytvořit nové vazebné motivy pro transkripční aktivátory, čímž by se zvýšila produkce HbF. Instalace těchto substitucí je ale velmi náročná (Mayuranathan et al., 2023).

Klinické hodnocení fáze II/III studie NCT03745287 bylo zaměřeno na inhibici BCL11A v HSC pomocí technologie CRISPR-Cas9. V této studii bylo dosaženo přibližně 80% úspěšnosti v modifikaci cílového genu. Takto upravené HSC byly následně transplantovány pacientům se srpkovitou anémií. Nastala u nich zvýšená produkce HbF, což značně pomohlo zmírnit příznaky tohoto onemocnění. V průběhu dvaceti čtyř měsíců po transplantaci většina pacientů neprodělala žádnou vazookluzivní krizi. Taktéž nebyl zaznamenán žádný případ, u kterého by došlo k selhání nebo odmítnutí transplantovaných buněk. Tyto pozitivní výsledky podpořili klinické využití *ex vivo* geneticky upravených HSC pro léčbu srpkovité anémie i dalších hemoglobinopatií, jako je β -talasémie. Na druhou stranu studie CEDAR, která se zaměřovala na využití technologie CRIPR-Cas9 k opravě mutace v HBB s cílem obnovit produkci HbA čelila komplikacím. U prvních pacientů, kterým byly podány upravené buňky, se rozvinula pancytopenie, trvalé snížený počet veškerých krevních elementů. To vedlo k pozastavení studie a v lednu 2023 byla předčasně ukončena (Dimitrievska et al., 2024).

Dne 8.12.2023 FDA schválila použití technologie CRISPR-Cas9 pro editaci genů jako léčebnou strategii pro srpkovitou anémií. Konkrétně se jedná o terapii nazvanou Casgevy, vyvinutou společností Vertex Pharmaceuticals a CRISPR Therapeutic. Tato jednorázová terapie je určena pacientům ve věku dvanácti let a více se srpkovitou anémií, kteří trpí častými vazookluzivními krizemi. Patnáctiletá bezpečnostní studie, která byla zahájena v roce 2021, zkoumá dlouhodobé účinky terapie Casgevy. Doposud nebyly zaznamenány žádné genotoxické účinky související s DSB. Schválení Casgevy představuje významný mezník v oboru genové terapie a potvrzuje velký potenciál technologie CRISPR-Cas9 (Dimitrievska et al., 2024).

Zároveň s metodou CRISPR byla schválena i další genová terapie pro léčbu srpkovité anémie, a to metoda Lovo-cel. Ta zahrnuje autologní transplantaci HSC,

kteře jsou transdukovány lentivirovým vektorem BB305, který kóduje β -globinový gen pro produkci anti-srpkovitěho HGB. Tento modifikovaný HGB, byl speciálně navržen s jedinou substitucí aminokyseliny threoninu na glutamin, aby stericky inhiboval polymerizaci HbS, zatímco si udržuje stejnou funkci jako HbA. Preklinické studie prokázaly, že endogenní exprese genu, který je modifikován prostřednictvím metody Lovo-cel snižuje expresi HbS a inhibuje jeho polymeraci. Účinnost a bezpečnost metody Lovo-cel se hodnotí ve fázi 1/2 probíhající studie HGB-206 (Kanter et al., 2023).

6.2 Transplantace hematopoetických kmenových buněk

Před objevem možnosti genové terapie byla HSCT jedinou léčbou s kurativním účinkem. V roce 1984 byla poprvé hlášena HSCT u pacienta se srpkovitou anémií, který byl transplantován pro akutní myeloidní leukémii. Podařilo se tak vyléčit pacienta z leukémie, ale zároveň u něj došlo i ke zvrácení srpkovité anémie. To podnítilo zvážit HSCT jako možnou kurativní terapii pro pacienty trpící srpkovitou anémií. V roce 1996 Walters a jeho kolegové publikovali první zprávu o úspěšném využití HSCT od sourozeneckého dárce s identickou shodou lidského leukocytárního antigenu (HLA) u dvaceti dvou pacientů. Od té doby bylo prokázáno, že HSCT vede k dlouhodobému vyléčení, zlepšení klinických projevů a stabilizaci orgánových funkcí. Ačkoliv HSCT může vést k úplnému vyléčení, pojí se s ní i několik závažných komplikací, které značně omezují její široké použití (Bhalla et al., 2023).

HSCT je lékařský postup, při kterém jsou buňky kostní dřeně pacienta nahrazeny zdravými kmenovými buňkami od vhodného dárce. Jedná se o alogenní transplantaci, jelikož buňky pocházejí od jiného jedince téhož druhu. Kmenové buňky pro transplantaci mohou být získány z kostní dřeně, periferní krve nebo z pupečníkové krve (Bazinet et al., 2019). Odběr kostní dřeně byl první zavedenou metodou pro odběr HSC, provádí se pod celkovou narkózou a buňky se odebírají ze zadního hřebenu kyčelního. Kvůli bezpečnosti a většímu pohodlí dárce se upřednostňuje odběr HSC z periferní krve. K mobilizaci HSC do oběhu se využívá G-CSF, kdy pět až šest dní po jeho podání se provede odběr buněk aferézou. Při alogenní transplantaci musí být vybrán vhodný dárce. Shoda HLA mezi příjemcem a dárce patří k nejsilnějším faktorům určujícím výsledek HSCT, jelikož je zásadní pro tkáňovou shodu. Pro shodu se berou v úvahu geny HLA -A, -B, -C, -DR, -DQ, a -DP. Při výběru dárce se zvažují i další faktory jako je věk a pohlaví. Přibližně u 30 % pacientů je k dispozici příbuzný HLA shodný dárce, který je vždy preferovanou volbou. U pacientů, kteří nemají takového dárce k dispozici je možnost využít shodného nepříbuzného

dárce. Avšak navzdory miliónům dobrovolných dárců může být náročné najít HLA shodného dárce, a to obzvlášť pro pacienty z etnických menšin. Právě jednou z překážek širokého využití HSCT je nedostatek vhodných dárců proto lze alternativně využít jako zdroj HSC pupečnickovou krev nebo haploidentického příbuzného dárce. Haplotypová shoda znamená, že mezi příjemcem a dárcem je shodný pouze jeden ze dvou haplotypů HLA (Balassa et al., 2019).

Komplikace, které se pojí s HSCT jsou odmítnutí štěpu, infekce a akutní nebo chronická reakce štěpu proti hostiteli (GVHD). V časném období po transplantaci může nastat akutní GVHD. Vzniká tehdy, když transplantované imunitní buňky rozpoznávají příjemce jako cizího a vyvolávají proti němu imunitní odpověď (Bazinet et al., 2019). Tato komplikace má na svědomí významnou mortalitu u pacientů, kteří podstupují HSCT. V pozdějším období po přihojení štěpu může dojít k rozvoji chronické GVHD, která způsobuje značné zhoršení kvality života pacientů a může vést až k invaliditě. Pacienti bývají nejvíce náchylní k infekcím během neutropenického období, kdy riziko infekcí významně klesá právě až po přihojení neutrofilů. Navíc pacienti vyžadují prodlouženou imunosupresi jako prevenci proti rozvoji GVHD, v důsledku toho se riziko infekcí zvyšuje po mnoho měsíců (Balassa et al., 2019). U pacientů, kteří podstoupí HSCT je nutné do šesti až dvanácti měsíců provést opět základní očkování (Bazinet et al., 2019).

Před samotným provedením transplantace je potřeba pacienta připravit na přijetí transplantovaných buněk. Tato přípravná fáze má za cíl ablaci kostní dřeně pacienta a navození dostatečné imunosuprese, aby proběhlo úspěšné uchycení a přihojení štěpu. K tomu je možné využít jeden z přípravných režimů, a to myeloablativní režimy nebo režimy se sníženou intenzitou. Myeloablativní přípravné režimy se skládají z vysoké dávky chemoterapie kombinované s ozařováním. Dojde tím ke zničení kostní dřeně a imunitního systému pacienta (Khemani et al., 2019). Používají se chemoterapeutické látky jako busulfan, cyklofosfamid a anti-thymocytární globulin, s použitím těchto látek se pojí riziko poškození orgánů v důsledku jejich toxicity. Kondiční režimy se sníženou intenzitou používají nižší dávky busulfanu nebo se podává fludabarin, a jsou využívány zejména za účelem lepší snášenlivosti (Saraf et al., 2019).

Neexistuje žádná univerzální indikace pro HSCT, jelikož symptomatická srpkovitá anémie není stále zcela jasně definována. Avšak přítomnost závažných komplikací jako jsou cévní mozková příhoda, akutní hrudní syndrom a bolestivé vazookluzivní krize, které si vyžadují hospitalizaci, jsou nespornou indikací pro HSCT (Leonard et al., 2018). Podle studie z roku 2016 byly u 41 % pacientů indikací k HSCT bolestivé vazookluzivní krize (Khemani et al., 2019). Ovšem ne všichni pacienti s potencionální indikací pro HSCT jsou zdravotně

způsobí tento zákrok podstoupit. Zejména kvůli náročné fázi kondicionování je potřeba, aby pacient měl přijatelnou srdeční, respirační, renální a jaterní funkci (Bazinet et al., 2019). Také nejvhodnější věk pro HSCT je stále předmětem diskuse, avšak transplantace provedené v raném věku jsou spojeny s lepšími výsledky. Řada odborníků se shoduje, že symptomatictí pacienti s HLA identickým dárcem by měli, pokud možnost podstoupit HSCT, ještě v předškolním věku (Khemani et al., 2019).

6.3 Podpůrná léčba

Před schválením genové terapie nebo v případech, kdy není nalezen vhodný dárc k HSCT, byla léčba srpkovité anémie omezena pouze na podpůrnou léčbu pomocí léků a krevních transfuzí. Nejedná se tedy o kurativní terapii, zaměřuje se zejména na zmírnění symptomů a snížení akutních komplikací, které vznikají v důsledku tohoto onemocnění. Možnosti podpůrné léčby zůstávají stále omezeny, dnes již existují čtyři léky pro léčbu srpkovité anémie, které byly schváleny FDA. A to hydroxyurea, L-glutamin, Voxelotor a Crizanlizumab (Germino-Watnick et al., 2022). Nejdéle známou a prozkoumanou je hydroxyurea. Po téměř dvě desetiletí byla jedinou schválenou farmakologickou terapií pro srpkovitou anémii. Později byly schváleny další nové léčebné postupy. A to v roce 2017 L-glutamin a v roce 2019 Crizanlizumab a Voxelotor. I přesto, že jsou tato tři léčiva z hlediska terapie atraktivní, jelikož jsou pacienty poměrně dobře snášeny a přináší uspokojivé výsledky v klinických studiích. Stýkají se s jednou velkou překážkou a tou je jejich vyšší cena a účast zdravotních pojišťoven na jejich hrazení. Jejich účinnost a mechanismy působení jsou nadále důkladně zkoumány, a to zejména u pacientů dětské populace. Na základě dosavadních klinických údajů bylo zjištěno, že podpůrná léčba nejlépe zabírá u pacientů s mírným průběhem srpkovité anémie. Dvě základní strategie pro zvládnání a zlepšení průběhu srpkovité anémie jsou krevní transfúze a užívání hydroxymočoviny, mají zásadní vliv na prodloužení délky života a zvýšení kvality života u pacientů, kteří trpí tímto onemocněním (Migotsky et al., 2022)

6.3.1 Hydroxyurea

Do 80. let 20. století byla jediná možná léčba srpkovité anémie podání krevních transfuzí, kdy v 90. letech přišla hydroxymočovina jako možná a účinná farmakologická terapie srpkovité anémie. Jedná se o chemickou sloučeninu, jejíž chemický vzorec je $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2$, a byla poprvé syntetizována v roce 1869. O sto let později získala své klinické využití, a to konkrétně jako chemoterapeutikum. Během následujících let se její využití rozšířilo na léčbu chronické myeloidní leukémie, lupénky, rakoviny vaječníků nebo polycytémii vera. Později byly během

studii taktéž prokázány její účinky indikovat vznik HbF při srpkovité anémii a roce 1998 získala hydroxymočovina schválení FDA využití jakožto terapeutického přípravku pro léčbu dospělých s těžkou formou srpkovité anémie (McGann et al., 2015). Dnes je hydroxymočovina schválena jak FDA, tak i v roce 2007 Evropskou lékovou agenturou (EMA). A to jakožto lék pro preventivní snížení vazookluzivních krizí a akutního hrudního syndromu u pacientů starších dvou let (Ferraresi et al., 2023). Nedávné studie na myším modelu ukázaly, že její podávání zlepšuje prostorovou paměť u Alzheimerovy choroby, a tedy by mohla být v budoucnu využívána pro oddálení poklesu kognitivních funkcí u Alzheimerovy choroby (Musiałek et al., 2021).

Léčba pomocí hydroxymočoviny je prozatím primární a nejlépe zavedou farmakologickou léčbou, u které je prokázáný pozitivní efekt na klinický průběh srpkovité anémie. Důležité je udržovat správné dávkování, které by mělo maximalizovat pozitivní efekt, ale zároveň by měla být minimalizována možnost toxicity (McGann et al., 2011).

Navzdory desetiletí zkoumání se stále zcela přesně nepovedly objasnit mechanismy, pomocí, kterých hydroxymočovina indukuje vznik HbF. Indukce HbF má u pacientů se srpkovitou anémií zlepšující účinky, co se průběhu nemoci týče. HbF se skládá ze 2 α -globinů a 2 γ -globinů, tudíž u něj zcela chybí zmutovaný β -globinový řetězec. Také má účinky proti srpkovatění erytrocytů, jelikož snižuje pravděpodobnost deoxygenace a polymerace

HbS (Germino-Watnick et al., 2022). Jejím primárním a zatím nejlépe objasněným mechanismem účinku je reverzibilní inhibice ribonukleotidreduktáz. Jedná se o enzymy, které katalyzují redukci ribonukleotidů na deoxyribonukleotidy, jež jsou nezbytné pro syntézu a opravu DNA. Účinky hydroxymočoviny nejvýrazněji ovlivňují S fázi buněčného cyklu. Zabraňuje syntéze nových řetězců DNA, čímž dochází k zastavení buněčného cyklu a aktivaci kontrolních bodů. Kvůli znemožnění procesu dělení dojde i k zastavení krvetvorby. Jedná se však o reverzibilní účinek a všechny tyto pochody v buňce jsou snadno vratné. Při vyšších koncentracích hydroxymočoviny nebo při dlouhodobému podávání může dojít k akumulaci poškozené DNA, to může vést až k buněčné smrti, nebo k zvýšené generaci ROS. U hydroxymočoviny tedy hrozí nebezpečí z hlediska její genotoxicity. Nedávné studie taktéž prokázaly, že kvůli své neúplné specifitě může ovlivnit větší počet enzymů, na což může buňka reagovat nepředvídatelně (Musiałek et al., 2021). Podávání hydroxymočoviny vede ke snížení počtu složek, které se podílejí na procesu vzniku vazookluze. Konkrétně se jedná o snížení počtu neutrofilů, trombocytů, retikulocytů a zánětlivých cytokinů. Společně s terapeutickou indikací HbF to vede ke snížení hemolýzy, ustálení stavu HGB a ke zlepšení reologie erytrocytů (Williams et al., 2018). Ukazuje se, že podávání hydroxymočoviny již

v prvním roce života dětských pacientů by mohlo mít neuroprotektivní účinek, což by mohlo vést ke zkvalitnění života v dospělosti pacientů (Ferraresi et al., 2023).

6.3.2 Crizanlizumab

V roce 2019 byl Crizanlizumab schválen pro léčbu srpkovité anémie u pacientů, kterým je šestnáct let a více. Schválila jej jak FDA, tak i EMA. Používá se zejména k prevenci proti bolestivým vazookluzivní krizím. Jedná se o humanizovanou IgG2 kappa monoklonální protilátku namířenou proti P-selektinu. P-selektin je adhezní molekula exprimovaná na aktivovaných endoteliálních buňkách a krevních destičkách. U pacientů se srpkovitou anémií je vysoká exprese této molekuly a je považována za jeden z hlavních faktorů v patogenezi tohoto onemocnění (Ferraresi et al., 2023). Adheze erytrocytů, leukocytů a trombocytů k endotelu je iniciována více molekulami, jako jsou L-selektin, P-selektin či E-selektiny. Ale nejhlavnější roli v aktivaci krevních destiček a koagulaci hraje právě P-selektin. Ten se nachází v zásobních granulech klidových endoteliálních buněk a v trombocytech. Po jejich aktivaci je transportován do buněčné membrány, čímž je exprimován na povrch buněk. To má za následek zvýšenou adhezi srpkovitých erytrocytů k cévám, tvorbu agregátů mezi trombocyty a vazbu leukocytů na endoteliální buňky. Tento proces zprostředkovává vznik vazookluze následovanou bolestivými krizemi (Ataga et al., 2017). Srpkovité erytrocyty jsou dvakrát až desetkrát více adherentní k vaskulárnímu endotelu než fyziologické (Levien et al., 2023).

Crizanlizumab má účinek takový, že blokuje interakci mezi P-selektinem a P-selektinovým glykoproteinovým ligandem 1 (PSGL-1). Ten je přítomen na leukocytech a také na erytrocytech je přítomen ligand velmi podobný PSGL-1. Touto blokadou znemožňuje interakci P-selektinu na povrchu cévního endotelu a krevních destiček s PSGL-1 na leukocytech a erytrocytech. (Stevens et al., 2021). Užívání tohoto léčiva vede ke snížení frekvence bolestivých krizí. A také ke zmírnění bolestí během nich, tudíž není potřeba podávat pacientům opioidy (Migotsky et al., 2022). Prevence proti těmto krizím má zásadní vliv na zlepšení životní kvality pacientů trpící srpkovitou anémií. Jelikož časté bolestivé epizody mohou být důvodem k invaliditě. Také snížení vazookluze vede ke zmírnění hypoxie tkání. To může vést k menšímu poškození koncových orgánů (Ataga et al., 2017). Byla také započata studie léčiva Inklakumabu, který také působí jako inhibitor P-selektinu (Ferraresi et al., 2023).

Doporučená dávka Crizanlizumabu je 5 miligramů na kilogram hmotnosti pacienta. Aplikace je intravenózně, kdy podání infuze trvá 30 minut. Po podání první dávky následuje druhá po čtrnácti dnech. Další dávky již následují, co čtyři týdny. Pacienti by měli být po dobu

podání infuze pod odborným dohledem a v případě vážné reakce by měla být ihned zastavena. Příznaky související přímo s infuzí mohou zahrnovat horečku, zimnici, nevolnost, zvracení závratě či únavu (Dick et al., 2022).

Objevuje se zde ale teoretické riziko spojené s užíváním Crizanlizumabu. A to, jestli kvůli leukocytární adhezi nebude u pacientů vyšší výskyt infekcí v důsledku sníženého počtu leukocytů (Karki et al., 2021).

6.3.3 L-glutamin

L-glutamin je nejrozšířenější aminokyselinou v lidském těle, která plní mnoho funkcí. Jedná se glukogenní aminokyselinu, která je nezbytná pro syntézu dalších aminokyselin, proteinů, nukleových kyselin a nukleotidů. Z hlediska terapeutického je zásadní, že se jedná o prekurzor syntézy antioxidantů, jako jsou redukovaný glutathion (GSH), oxid dusnatý a kofaktoru nikotinamid adenindinukleotid (NAD). Ty chrání erythrocyty před oxidačním poškozením (Quinn, 2018).

L-glutamin patří mezi neesenciální aminokyseliny, tedy není nutné ji přijímat z potravy. U lidí trpících srpkovitou anémií je ale obrat červených krvinek v důsledku hemolýzy tak vysoký, že se pro ně stává podmíněně esenciální a je nutná její suplementace. Terapeutický účinek L-glutaminu tkví v jeho antioxidačních účincích. Oxidační stres je jeden z hlavních faktorů v patofyziologii srpkovité anémie. Bylo dokázáno, že v srpkovitých erythrocytech se nachází vyšší množství ROS než v těch fyziologických (Sadaf et al., 2020).

Aby se zabránilo vzniku nadměrného ROS mají buňky antioxidační dráhy, které zahrnují právě GSH, NAD(H) a NO. NAD a jeho redukovaná forma NADH jsou důležité faktory v udržování redoxní rovnováhy v červených krvinkách. U srpkovitých erythrocytů je snížený redoxní potenciál NAD, což se projevuje sníženým poměrem redukovaného NADH oproti celkovému NAD (Niihara et al., 2018). Glutathion existuje jak v redukované formě, tak i oxidované formě. GSH slouží k tomu, že vychytává ROS, jako jsou peroxid vodíku a peroxidy lipidů. Také interaguje s HGB za vzniku glutathionového HGB, který snižuje náchylnost erythrocytů k srpkovatění. Existují dvě cesty, kterými je GSH syntetizován v erythrocytech. První je syntéza *de novo*, která vyžaduje přítomnost aminokyselin glycinu, glutamátu a cysteinu. Druhou cestou je regenerace oxidovaného glutathionu, k čemuž je potřeba dostatek kofaktoru NADPH. Ve fyziologických erythrocytech se za normálních oxidačních podmínek udržuje uvnitř buňky dostatečná hladina GSH. A to pomocí enzymu glutathionreduktázy, která zprostředkovává právě regeneraci GSH z jeho oxidované formy. Oxidační stres také způsobuje zvýšenou spotřebu glutathionu v srpkovitých erythrocytech (Sadaf et al., 2020).

Zvýšený transport glutaminu do srpkovitých erytrocytů je důsledkem jejich zvýšené afinitě ke glutaminu a vysoké rychlosti Na-dependentního transportéru glutaminu. Přesto v těchto erytrocytech není zvýšená hladina glutaminu, avšak je v nich zvýšen obsah glutamátu. Ten je vedlejším produktem při syntéze NAD z glutaminu. Tento proces je reakcí na oxidační poškození srpkovitých erytrocytů, což vede k vyšší spotřebě NAD a tím k vyššímu vstřebávání glutaminu za účelem zvýšené syntézy NAD (Quinn, 2018).

Mechanismus účinku L-glutaminu není stále zcela objasněn. Předpokládá se, že jeho pozitivní účinky spočívají v redukci oxidačního stresu a snížení náchylnosti erytrocytů k srpkovatění. To by mohlo být způsobeno zvýšenou syntézou GSH *de novo* díky jeho suplementaci. Nicméně doposud nebylo prokázáno, že by užívání L-glutaminu vedlo ke zlepšení hodnoty hematokritu nebo retikulocytů. Z toho důvodu se předpokládá, že přímo neovlivňuje proces hemolýzy (Quinn, 2018). Léčba L-glutaminem získala schválení od FDA v roce 2017 pro pacienty trpící srpkovitou anémií starší pěti let (Ferraresi et al., 2023). Užívání tohoto léčiva je spojeno se snížením počtu bolestivých krizí a nutných hospitalizací v nemocnici. Při jeho užívání v doporučených dávkách se nevyskytují žádné závažné komplikace a je dobře pacienty tolerován při krátkodobém užívání. Mezi nejčastější vedlejší účinky patří zácpa, nevolnost, zvracení a bolesti břicha a hlavy. Podává se ve formě tablet k perorálnímu užití. Obvykle se smíchají jeden až tři sáčky s nápojem dvakrát denně (Migotsky et al., 2022).

Jeho užívání nevyžaduje pravidelné monitorování účinků léčby, což je z hlediska pacienta atraktivní. Jedná se o finančně nákladnou terapii, jelikož měsíční dávka L-glutaminu pro léčbu srpkovité anémie je dvacetkrát dražší než léčba pomocí hydroxymočoviny (Quinn, 2018). Ideální použití je v kombinaci s hydroxymočovinou, zejména u pacientů, kteří jsou pomocí hydroxymočoviny udržováni v optimalizovaném stavu. L-glutamin by mohl být zvažován jako primární lék pro pacienty, kteří nemohou užívat hydroxymočovinu (Migotsky et al., 2022).

6.3.4 Voxelotor

Voxelotor dříve známý pod názvem GBT440 je prvním perorálním léčivem svého druhu pro léčbu srpkovité anémie, jehož principem je změna afinity mezi HGB a kyslíkem. Jedná se o malou molekulu, která funguje jako inhibitor polymerizace HbS. Působí prostřednictvím vytvoření kovalentní vazby s aminokyselinou valinem na N-konci β -globinového řetězce v molekule HGB. Tím dochází k alosterické modifikaci HGB, která vede ke zvýšení jeho afinitě ke kyslíku. Voxelotor zpomaluje polymerizaci HbS, jelikož ten není schopen

v oksylovaném stavu polymerizovat a zároveň tak nemůže docházet k deformaci erytrocytů do srpkovitého tvaru (AlDallal, 2020).

U pacientů se srpkovitou anémií se v dnešní době sice daří prodloužit délku jejich života, avšak někdy to bývá na úkor kvality, jelikož s přibývajícím věkem často dochází k akumulaci orgánových dysfunkcí. Doposud se veškerá léčiva zaměřovala zejména na paliaci akutních komplikací, a tak chyběla taková, která by umožňovala předcházet orgánovému poškození. Voxelotor se tedy stal prvním léčivem, které svým mechanismem účinku přímo zasahuje do základní patologie onemocnění, a tak je možné předcházet trvalému poškození orgánů (Glaros et al., 2021).

V roce 2019 získal Voxelotor schválení k léčbě pacientů od šestnáctého roku života a schválila jej jak FDA, tak i EMA. Během studií se ukázalo, že užívání Voxelotoru vede ke zvýšení koncentrace hemoglobinu a ke snížení markerů hemolýzy (AlDallal, 2020). Právě díky jeho prokázané schopnosti zvýšit hodnoty hemoglobinu o 1 g/dl získal zrychlený schvalovací proces (Glaros et al., 2021). *In vitro* studie se vzorky krve od pacientů prokázaly, že je toto léčivo velmi specifické pro HGB. V minulosti byly zkoumány i jiné alosterické modifikátory jako valerosol nebo tucaresol. Sice bylo prokázáno, že snižují míru srpkovatení erytrocytů, avšak právě kvůli jejich nízké specifitě pro HGB bylo od nich zcela opuštěno. Během studií Voxelotor taktéž vykazoval velmi příznivý biologický poločas, a tak stačí, aby pacienti užívali jednu dávku denně (AlDallal, 2020).

6.3.5 Krevní transfuze

Výměnná transfuze erytrocytů je standardní složkou péče o akutní i chronické komplikace spojené se srpkovitou anémií. Klíčová je obzvláště pro pacienty, kteří nemohou podstoupit kurativní terapii nebo nemohou užívat léčiva modifikující toto onemocnění (Linder et al., 2021). Jedná se o podání červených krvinek od zdravého dárce, při kterém jsou současně odstraněny pacientovy červené krvinky (Abdel-Hadi et al., 2023). Běžně se využívá automatizovaná výměnná transfuze erytrocytů, pro kterou je ale potřeba speciálního vybavení a obsluha vyškolených personálem. To ale nebývá zcela běžně dostupnou záležitostí v rozvojových zemích, kde je právě výskyt srpkovité anémie nejvyšší (Inusa et al., 2023). Chronická transfuzní terapie je ve vyspělých zemích předepisována přibližně u 10 % pacientů a asi 90 % dospělých pacientů trpící srpkovitou anémií vyžaduje alespoň jedenkrát za život podání krevní transfuze (Linder et al., 2021). Hlavním cílem je u pacientů snížit hladiny HbS pod takovou úroveň, aby se co nejvíce minimalizovalo riziko vzniku komplikací. A to tak, že se pomocí transfuze snižuje množství cirkulujících srpkovitých erytrocytů v krvi pacientů, čímž

dojde i ke zlepšení mikrovaskulárního průtoku krve. Indikací k transfuzi je kromě předoperační přípravy také prevence proti primární a sekundární mozkové příhodě, tichým infarktům, akutnímu koronárnímu syndromu nebo zvládnutí bolestivých vazookluzivních krizí. Tato terapie s sebou přináší i několik potenciálních vedlejších účinků a komplikací. Ty zahrnují přetížení železem, akutní nebo opožděnou hemolytickou transfuzní reakci (HTR) a přenos infekčních chorob (Kato et al., 2018).

Časté krevní transfuze vedou k přetížení železem, což může významně poškodit životně důležité orgány, jako jsou srdce, játra nebo endokrinní žlázy. U pacientů, kteří pravidelně podstupují transfuze, se doporučuje provádět screening na přetížení železem pomocí magnetické rezonance jater každé jeden až dva roky. Předtím než byla dostupná možnost chelatační terapie docházelo u některých pacientů závislých na chronické transfuzi k úmrtí z důvodu kardiomyopatie, způsobené právě přetížením železem. V Evropě jsou široce využívány tři licencované chelátory železa, ty vytvoří s železem stabilní komplexy, které jsou později vyloučeny z těla ven. Patří mezi ně deferoxamin, který se aplikuje subkutánně a dále deferasirox a deferipron, jejich podání je orální cestou. Užívání chelatačních přípravků je zásadní pro správný průběh terapie obzvláště u dětských pacientů, bohužel v rozvojových zemích nejsou stále běžně dostupné zejména z finančních důvodů (Inusa et al., 2023).

Pokud u pacientů nastane HTR dochází u nich ke zrychlené destrukci transfundovaných červených krvinek nebo jejich vlastních krvinek, ve zvláštních případech může dojít k destrukci obojího. Základní příčinou většiny HTR bývá aloimunizace, jedná se o imunitní reakci, při níž tělo pacienta vytváří protilátky proti antigenům na erytrocytech. K HTR dochází z toho důvodu, že často je transfuzní sérologie omezena pouze na AB0/RhD typizaci. Přístup k rozšířené fenotypizaci, by zajistil zvýšenou senzibilizaci erytrocytů, čímž by se významně snížila pravděpodobnost vzniku HTR. U pacientů trpících srpkovitou anémií, je výskyt aloimunizace vyšší než u kterékoliv jiné studované skupiny, pravděpodobně právě kvůli vysoké transfuzní zátěži a velké Rh diverzitě. Pacientům, u kterých se v minulosti vyskytla HTR je podána imunosupresivní léčba (Zheng et al., 2021).

V rozvojových zemích je značně omezený přístup ke zdravé a bezpečné krvi. Obecně v těchto zemích je dárcovství krve omezeno špatnou zdravotnickou infrastrukturou, nízkou informovaností široké veřejnosti a stigmatizací dobrovolného dárcovství. Míra dobrovolného dárcovství krve v těchto zemích je 5 až 6,6 dárců na 1000 obyvatel ve srovnání s 31,5 dárci na 1000 obyvatel ve vyspělých zemích. WHO doporučuje provádět screening na HIV, hepatitidu B a C a na syfilis, a to podle požadavků na systém kvality. Další rutinní

screening je poté doporučován v oblastech, ve kterých je hojný výskyt onemocnění, jako jsou malárie, Chagasova choroba nebo cytomegalovirus. V rozvojových zemích pouze 76 % odběrů splňuje tato kritéria oproti tomu ve vyspělých zemích je to 99,8 % odběrů (Inusa et al., 2023)

ZÁVĚR

Srpkovitá anémie je život ohrožující onemocnění, které se vyznačuje hemolytickou anémií, bolestivými vazookluzivními krizemi a progresivním poškozením orgánů. Projevy onemocnění výrazně zasahují do každodenního života pacientů a negativně ovlivňují jejich fyzický a psychosociální stav. Pro zdravotnické pracovníky, pacienty a jejich rodinné příslušníky je zásadní pochopení příčin, příznaků a možností léčby proto, aby mohla být zajištěna včasná a přesná diagnostiku, efektivní zvládnání symptomů a celkové zlepšení kvality života pacientů. Komplikace spojené se srpkovitou anémií také představují významnou zátěž pro zdravotnické systémy, jelikož pacienti často vyžadují hospitalizace a potřebují specializovanou péči.

Současná léčba srpkovité anémie se opírá zejména o terapie modifikující onemocnění, které významně snižují, ale zcela neodstraňují symptomy, ani neléčí příčinu onemocnění. Před schválením genových terapií CRISPR a Lovo-cel byla jedinou kurativní léčbou transplantace hematopoetických kmenových buněk, která vyžaduje dárce se shodným lidským leukocytárním antigenem. Pokroky v genové terapii přinesly naději na lepší budoucnost pro širokou škálu pacientů se srpkovitou anémií, jelikož tyto terapie eliminují dvě hlavní komplikace, a to odmítnutí štěpu a nutnost nalezení adekvátního dárce. Technologie CRISPR přinesla rapidní změny v oblasti výzkumu a medicíny díky své jednoduchosti a účinnosti.

Kromě léčby monogenních onemocnění, jako je srpkovitá anémie, β -talasémie nebo Duchennova svalová dystrofie, se diskutuje i o potenciálu pro léčbu komplexních heterogenních onemocnění jako je rakovina, HIV či diabetes. Mnoho buněčných terapeutických produktů upravených pomocí technologie CRISPR je stále v raných fázích klinického vývoje a současné klinické studie mají omezenou délku. Navzdory významnému pokroku v porozumění a léčbě srpkovité anémie, je stále zapotřebí dalších výzkumů, které by prohloubily znalosti o tomto onemocnění a zlepšily by celkové výsledky léčby.

POUŽITÁ LITERATURA

1. ABDEL-HADI, Loubna; CARMENATE, Yendry V.; CASTILLO-ALEMAN, Yandy M.; SHEIKH, Samira; ZAKARIA, Aya et al. Treatment of sickle cell disease - options and perspective. *American Journal of Blood Research*. 2023, roč. 13, č. 2, s. 61-70. PMID: 37214647.
2. ABRAHAM, Allistair A. a TISDALE, John F. Gene therapy for sickle cell disease: moving from the bench to the bedside. *Blood*. 2021, roč. 138, č. 11, s. 932-941. DOI: 10.1111/ijlh.13885.
3. AHMED, Mostafa H.; GHATGE, Mohini S. a SAFO, Martin K. Hemoglobin: Structure, Function and Allostery. In: HOEGGER, Ulrich a HARRIS, J. Robin (ed.). *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins. Subcellular Biochemistry*. Cham: Springer International Publishing, 2020, s. DOI: 10.1007/978-3-030-41769-7_14.
4. ALDALLAL, Salma M. Voxelotor: A Ray of Hope for Sickle Disease. *Cureus*. DOI: 10.7759/cureus.7105.
5. ALLALI, Slimane; MACIEL, Thiago Trovati; HERMINE, Olivier a DE MONTALEMBERT, Mariane. Innate immune cells, major protagonists of sickle cell disease pathophysiology. *Haematologica*. 2020, roč. 105, č. 2, s. 273-283. DOI: 10.3324/haematol.2019.229989.
6. ARISHI, Wjdan A.; ALHADRAMI, Hani A. a ZOUROB, Mohammed. Techniques for the Detection of Sickle Cell Disease: A Review. *Micromachines*. 2021, roč. 12, č. 5. DOI: 10.3390/mi12050519.
7. ASHROBI, Damilola; RAMSEY, Adam; KILLEEN Robert B. a BHATT, Ruchi. Sickle Cell Trait. *StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*. PMID: 30725815
8. ATAGA, Kenneth I.; KUTLAR, Abdullah; KANTER, Julie; LILES, Darla; CANCADO, Rodolfo et al. Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine*. 2017, roč. 376, č. 5, s. 429-439. DOI: 10.1056/NEJMoa1611770.

9. BALASSA, Katalin; DANBY, Robert a ROCHA, Vanderson. Haematopoietic stem cell transplants: principles and indications. *British Journal of Hospital Medicine*. 2019, roč. 80, č. 1, s. 33-39. DOI: 10.12968/hmed.2019.80.1.33.
10. BAZINET, A. a POPRADI, G. A General Practitioner's Guide to Hematopoietic Stem-cell Transplantation. *Current Oncology*. 2019, roč. 26, č. 3, s. 187-191. DOI: 10.3747/co.26.5033.
11. BETTIOL, Alessandra; GALORA, Silvia; ARGENTO, Flavia Rita; FINI, Eleonora; EMMI, Giacomo et al. Erythrocyte oxidative stress and thrombosis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2022, roč. 24. DOI: 10.1017/erm.2022.25:
12. BHALLA, Nishka; BHARGAV, Anjali; YADAV, Sandeep Kumar a SINGH, Aloukick Kumar. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation to cure sickle cell disease: A review. *Frontiers in Medicine*. 2023, roč. 10. DOI: 10.3389/fmed.2023.1036939.
13. BHOKISHAM, Narendranath; LAUDERMILCH, Ethan; TRAEGER, Lindsay L.; BONILLA, Tonya D.; RUIZ-ESTEVEZ, Mercedes et al. CRISPR-Cas System: The Current and Emerging Translational Landscape. *Cells*. 2023, roč. 12, č. 8. DOI: 10.3390/cells12081103.
14. BUHARI, Hauwa Ali; AHMAD, Aisha Sa'ad a OBEAGU, Emmanuel Ifeanyi. Current Advances in the Diagnosis and Treatment of Sickle Cell Anaemia. *Newport International Journal of Biological and Applied Sciences*. 2023, roč. 4, č. 1, s. 1-10. DOI: 10.59298/NIJBAS/2023/1.1.11111.
15. CEGLIE, Giulia; LECIS, Marco; CANCIANI, Gabriele; ALGERI, Mattia a FRATI, Giacomo. Genome editing for sickle cell disease: still time to correct? *Frontiers in Pediatrics*. 2023, roč. 11. DOI: 10.3389/fped.2023.1249275.
16. CROSSLEY, Merlin; CHRISTAKOPOULOS, Georgios E. a WEISS, Mitchell J. Effective therapies for sickle cell disease: are we there yet? *Trends in Genetics*. 2022, roč. 38, č. 12, s. 1284-1298. DOI: 10.1016/j.tig.2022.07.003.
17. DEMIRCI, Selami; LEONARD, Alexis; ESSAWI, Khaled a TISDALE, John F. CRISPR-Cas9 to induce fetal hemoglobin for the treatment of sickle cell disease. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*. 2021, roč. 23, s. 276-285. DOI: 10.1016/j.omtm.2021.09.010
18. DHALIWAL, Gurbert; CORNETT, Patricia A. a TIERNEY, Lawrence M, JR. Hemolytic Anemia. *American Family Physician*. 2004, roč. 69, č. 11, s. 2599-2607. PMID: 15202694
19. DICK, Maurice H; ABDELGADIR, Arowa; KULKARNI, Vaishnavi Vijaya; AKRAM, Hamna; CHATTERJEE, Abanti et al. Comparing the Safety and Efficacy of L-Glutamine,

Voxelotor, and Crizanlizumab for Reducing the Frequency of Vaso-Occlusive Crisis in Sickle Cell Disease: A Systematic Review. *Cureus*. DOI: 10.7759/cereus.24920.

20. DIMITRIEVSKA, Marija; BANSAL, Dravie; VITALE, Marta; STROUBOULIS, John; MICCIO, Annarita et al. Revolutionising healing: Gene Editing's breakthrough against sickle cell disease. *Blood Reviews*. 2024, roč. 65. DOI: 10.1016/j.blre.2024.101185.

21. EATON, William A. Hemoglobin S polymerization and sickle cell disease Science paper: A retrospective on the occasion of the 70th anniversary of Pauling's Science paper. *American Journal of Hematology*. 2020, roč. 95, č. 2, s. 205-211. DOI: 10.1002/ajh.25687.

22. ELENDU, Chukwuka; AMAECHI, Dependable C.; ALAKWE-OJIMBA, Chisom E.; ELENDU, Tochi C.; ELENDU, Rhoda C. et al. Understanding Sickle cell disease: Causes, symptoms, and treatment options. *Medicine*. 2023, roč. 102, č. 38. DOI: 10.1097/MD.00000000000035237.

23. FERRARESI, Marta; PANZIERI, Daniele Lello; LEONI, Simona; CAPPELLINI, Maria Domenica; KATTAMIS, Antonis et al. Therapeutic perspective for children and young adults living with thalassemia and sickle cell disease. *European Journal of Pediatrics*. 2023, roč. 182, č. 6, s. 2509-2519. DOI: 10.1007/s00431-023-04900-w.

24. FRACZEK, Marcin G.; NASEEB, Samina a DELNERI, Daniela. History of genome editing in yeast. *Yeast*. 2018, roč. 35, č. 5, s. 361-368. DOI: 10.1002/yea.3308.

25. FRÖMMEL, Claudia. Newborn Screening for Sickle Cell Disease and Other Hemoglobinopathies: A Short Review on Classical Laboratory Methods—Isoelectric Focusing, HPLC, and Capillary Electrophoresis. *International Journal of Neonatal Screening*. 2018, roč. 4, č. 4. DOI: 10.3390/ijns4040039.

26. GERMINO-WATNICK, Paula; HINDS, Malikiya; LE, Anh; CHU, Rebecca; LIU, Xiong et al. Hematopoietic Stem Cell Gene-Addition/Editing Therapy in Sickle Cell Disease. *Cells*. 2022, roč. 11, č. 11. DOI: 10.3390/cells11111843.

27. GLAROS, Alexander K.; RAZVI, Reza; SHAH, Nirmish a ZAIDI, Ahmar U. Voxelotor: alteration of sickle cell disease pathophysiology by a first-in-class polymerization inhibitor. *Therapeutic Advances in Hematology*. 2021, roč. 12. DOI: 10.1177/20406207211001136.

28. GOSTIMSKAYA, Irina. CRISPR–Cas9: A History of Its Discovery and Ethical Considerations of Its Use in Genome Editing. *Biochemistry (Moscow)*. 2022, roč. 87, č. 8, s. 777-788. DOI: 10.1134/S0006297922080090.

- 29.** HARDOUIN, Giulia; MAGRIN, Elisa; CORSIA, Alice; CAVAZZANA, Marina; MICCIO, Annarita et al. Sickle Cell Disease: From Genetics to Curative Approaches. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2023, roč. 24, č. 1, s. 255-275. DOI: 10.1146/annurev-genom-120122-081037.
- 30.** HARTEVELD, Cornelis L.; ACHOUR, Ahlem; ARKESTEIJN, Sandra J. G.; TER HUURNE, Jeanet; VERSCHUREN, Maaïke et al. The hemoglobinopathies, molecular disease mechanisms and diagnostics. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2022, roč. 44, č. S1, s. 28-36. DOI: 10.1111/ijlh.13885.
- 31.** INUSA, Baba PD; ATOYEBI, Wale; ANDEMARIAM, Biree; HOURANI, James N. a OMERT, Laurel. Global burden of transfusion in sickle cell disease. *Transfusion and Apheresis Science*. 2023, roč. 62, č. 5. DOI: 10.1016/j.transci.2023.103764.
- 32.** INUSA, Baba; HSU, Lewis; KOHLI, Neeraj; PATEL, Anissa; OMINU-EVBOTA, Kilali et al. Sickle Cell Disease—Genetics, Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatment. *International Journal of Neonatal Screening*. 2019, roč. 5, č. 2. DOI: 10.3390/ijns5020020.
- 33.** ISHINO, Yoshizumi; KRUPOVIC, Mart; FORTERRE, Patrick a MARGOLIN, William. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *Journal of Bacteriology*. 2018, roč. 200, č. 7. DOI: 10.1128/JB.00580-17.
- 34.** JAVAID, Darakhshan; GANIE, Shahid Yousuf; HAJAM, Younis Ahmad a RESHI, Mohd Salim. CRISPR/Cas9 system: a reliable and facile genome editing tool in modern biology. *Molecular Biology Reports*. 2022, roč. 49, č. 12, s. 12133-12150. DOI: 10.1007/s11033-022-07880-6.
- 35.** KANTER, Julie; THOMPSON, Alexis A.; PIERCIEY, Francis J.; HSIEH, Matthew; UCHIDA, Naoya et al. Lovo-cel gene therapy for sickle cell disease HGB -206 study: Treatment process evolution and outcomes in the initial groups of the HGB -206 study. *American Journal of Hematology*. 2023, roč. 98, č. 1, s. 11-22. DOI: 10.1002/ajh.26741.
- 36.** KARKI, Nabin Raj a KUTLAR, Abdullah. P-Selectin Blockade in the Treatment of Painful Vaso-Occlusive Crises in Sickle Cell Disease: A Spotlight on Crizanlizumab. *Journal of Pain Research*. 2021, roč. 14, s. 849-856. DOI: 10.2147/JPR.S278285.
- 37.** KATO, Gregory J.; PIEL, Frédéric B.; REID, Clarice D.; GASTON, Marilyn H.; OHENE-FREMPONG, Kwaku et al. Sickle cell disease. *Nature Reviews Disease Primers*. 2018, roč. 4, č. 1. DOI: 10.1038/nrdp.2018.10.

38. KHALIL, Ahmad M. The genome editing revolution: review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2020, roč. 18, č. 1. DOI: 10.1186/s43141-020-00078-y.
39. KHEMANI, Kirshma; KATOCH, Deeksha a KRISHNAMURTI, Lakshmanan. Curative Therapies for Sickle Cell Disease. *Ochsner Journal*. 2019, roč. 19, č. 2, s. 131-137. DOI: 10.31486/toj.18.0044.
40. KOHNE, Elisabeth. Hemoglobinopathies. *Deutsches Ärzteblatt international*. 2011. DOI: 10.3238/arztebl.2011.0532.
41. KOZOVSKA, Z.; RAJCANIOVA, S.; MUNTEANU, P.; DZACOVSKA, S. a DEMKOVA, L. CRISPR: History and perspectives to the future. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021, roč. 141. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111917.
42. LEONARD, Alexis a TISDALE, John F. Stem cell transplantation in sickle cell disease: therapeutic potential and challenges faced. *Expert Review of Hematology*. 2018, roč. 11, č. 7, s. 547-565. DOI: 10.1080/17474086.2018.1486703.
43. LEONOVA, Elena I. a GAINETDINOV, Raul R. CRISPR/Cas9 Technology in Translational Biomedicine. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2020, roč. 54, č. 3, s. 354-370. DOI: 10.33594/000000224.
44. LEVIEN, Terri L. a BAKER, Danial E. Crizanlizumab. *Hospital Pharmacy*. 2023, roč. 58, č. 1, s. 23-29. DOI: 10.1177/0018578720925373.
45. LINDER, Grace E. a CHOU, Stella T. Red cell transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. *Haematologica*. 2021, roč. 106, č. 7, s. 1805-1815. DOI: 10.3324/haematol.2020.270546.
46. MAITRA, Mausumi; KUMAR GUPTA, Rahul a MUKHERJEE, Manali. Detection and Counting of Red Blood Cells in Blood Cell Images using Hough Transform. *International Journal of Computer Applications*. 2012, roč. 53, č. 16, s. 13-17. DOI: 10.5120/8505-2274.
47. MAKAROVA, Kira S.; WOLF, Yuri I.; IRANZO, Jaime; SHMAKOV, Sergey A.; ALKHNABASHI, Omer S. et al. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*. 2020, roč. 18, č. 2, s. 67-83. DOI: 10.38/s41579-019-0299-x.
48. MAYURANATHAN, Thiyagaraj; NEWBY, Gregory A.; FENG, Ruopeng; YAO, Yu; MAYBERRY, Kalin D. et al. Potent and uniform fetal hemoglobin induction via base editing. *Nature Genetics*. 2023, roč. 55, č. 7, s. 1210-1220. DOI: 10.1038/s41588-023-01434-7.

- 49.** MCGANN, Patrick T a WARE, Russell E. Hydroxyurea for sickle cell anemia: what have we learned and what questions still remain? *Current Opinion in Hematology*. 2011, roč. 18, č. 3, s. 158-165. DOI: 10.1097/MOH.0b013e32834521dd.
- 50.** MCGANN, Patrick T a WARE, Russell E. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. *Expert Opinion on Drug Safety*. 2015, roč. 14, č. 11, s. 1749-1758. DOI: 10.1517/14740338.2015.1088827.
- 51.** MIGOTSKY, Michael; BEESTRUM, Molly a BADAWEY, Sherif M. Recent Advances in Sickle-Cell Disease Therapies: A Review of Voxelotor, Crizanlizumab, and L-glutamine. *Pharmacy*. 2022, roč. 10, č. 5. DOI: 10.3390/pharmacy10050123.
- 52.** MOTOCHÉ-MONAR, Cristófer; ORDOÑÉZ, Julián E.; CHANG, Oscar a GONZALES-ZUBIATE, Fernando A. GRNA Design: How Its Evolution Impacted on CRISPR/Cas9 Systems Refinement. *Biomolecules*. 2023, roč. 13, č. 12. DOI: 10.3390/biom13121698.
- 53.** MUSIAŁEK, Marcelina W. a RYBACZEK, Dorota. Hydroxyurea—The Good, the Bad and the Ugly. *Genes*. 2021, roč. 12, č. 7. DOI: 10.3390/genes12071096.
- 54.** NADER, Elie; ROMANA, Marc a CONNES, Philippe. The Red Blood Cell—Inflammation Vicious Circle in Sickle Cell Disease. *Frontiers in Immunology*. 2020, roč. 11. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00454.
- 55.** NIDHI, Sweta; ANAND, Uttpal; OLEKSAK, Patrik; TRIPATHI, Pooja; LAL, Jonathan A. et al. Novel CRISPR–Cas Systems: An Updated Review of the Current Achievements, Applications, and Future Research Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 7. DOI: 10.3390/ijms22073327.
- 56.** NIGAM, Rashi; SHARDA, Bela a VARMA, Amit V. Comparative study of sickling test, solubility test, and hemoglobin electrophoresis in sickle cell anemia. *MGM Journal of Medical Sciences*. 2024, roč. 11, č. 1, s. 31-37. DOI: 10.4103/mgmj.mgmj_31_24.
- 57.** NIIHARA, Yutaka; MILLER, Scott T.; KANTER, Julie; LANZKRON, Sophie; SMITH, Wally R. et al. A Phase 3 Trial of L-Glutamine in Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine*. 2018, roč. 379, č. 3, s. 226-235. DOI: 10.1056/NEJMoa1715971.
- 58.** ODAME, Isaac a JAIN, Dipty. Sickle cell disease: Progress made & challenges ahead. *Indian Journal of Medical Research*. 2020, roč. 151, č. 6. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR_2064_20.

- 59.** ODAME, Isaac. Sickle cell disease in children: an update of the evidence in low- and middle-income settings. *Archives of Disease in Childhood*. 2023, roč. 108, č. 2, s. 108-114. DOI: 10.1136/archdischild-2021-323633.
- 60.** PARUMS, Dinah V. Editorial: First Regulatory Approvals for CRISPR-Cas9 Therapeutic Gene Editing for Sickle Cell Disease and Transfusion-Dependent β -Thalassemia. *Medical Science Monitor*. 2024, roč. 30. DOI: 10.12659/MSM.944204.
- 61.** QUINN, Charles T. L-Glutamine for sickle cell anemia: more questions than answers. *Blood*. 2018, roč. 132, č. 7, s. 689-693. DOI: 10.1182/blood-2018-03-834440.
- 62.** RISINGER, Mary a KALFA, Theodosia A. Red cell membrane disorders: structure meets function. *Blood*. 2020, roč. 136, č. 11, s. 1250-1261. DOI: 10.1182/blood.2019000946.
- 63.** SADAF, Alina a QUINN, Charles T. L-glutamine for sickle cell disease: Knight or pawn? *Experimental Biology and Medicine*. 2020, roč. 245, č. 2, s. 146-154. DOI: 10.1177/1535370219900637.
- 64.** SAMUEL, Shirly S. a JAIN, Nikita. Sickle Cell Hepatopathy. *StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*. PMID: 34662016.
- 65.** SARAF, Santosh L. a RONDELLI, Damiano. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Adults with Sickle Cell Disease. *Journal of Clinical Medicine*. 2019, roč. 8, č. 10. DOI:10.3390/jcm8101565.
- 66.** SMITH, J. E. Erythrocyte Membrane: Structure, Function, and Pathophysiology. *Veterinary Pathology*. 1987, roč. 24, č. 6, s. 471-476. DOI: 10.1177/030098588702400601.
- 67.** STEVENS, Debra L.; HIX, Meri a GILDON, Brooke L. Crizanlizumab for the Prevention of Vaso-Occlusive Pain Crises in Sickle Cell Disease. *Journal of Pharmacy Technology*. 2021, roč. 37, č. 4, s. 209-215. DOI: 10.1177/87551225211008460.
- 68.** SUNDD, Prithu; GLADWIN, Mark T. a NOVELLI, Enrico M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2019, roč. 14, č. 1, s. 263-292. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012838.
- 69.** THE LANCET. The promise of genetic therapies in sickle cell disease. *The Lancet*. 2023, roč. 402, č. 10419. DOI: 10.1016/S0140-6736(23)02797-6.

70. THOM, C. S.; DICKSON, C. F.; GELL, D. A. a WEISS, M. J. Hemoglobin Variants: Biochemical Properties and Clinical Correlates. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2013, roč. 3, č. 3, s. a011858-a011858. DOI: 10.1101/cshperspect.a011858.
71. TISDALE, John F.; THEIN, Swee Lay a EATON, William A. Treating sickle cell anemia. *Science*. 2020, roč. 367, č. 6483, s. 1198-1199. DOI: 10.1126/science.aba.3827.
72. UTSUGISAWA, Taiju a KANNO, Hitoshi. Hemoglobinopathies. *Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy*. 2022, roč. 68., č. 1, s. 3—11. DOI: 10.3925/jjtc.68.3.
73. WILBER, Andrew; NIENHUIS, Arthur W. a PERSONS, Derek A. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities. *Blood*. 2011, roč. 117, č. 15, s. 3945-3953. DOI: 10.1182/blood-2010-11-316893.
74. WILKINSON, Royce A.; MARTIN, Coleman; NEMUDRYI, Artem A. a WIEDENHEFT, Blake. CRISPR RNA-guided autonomous delivery of Cas9. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2019, roč. 26, č. 1, s. 14-24. DOI: 10.1038/s41594-018-0173-y.
75. WILLIAMS, Thomas N. a THEIN, Swee Lay. Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2018, roč. 19, č. 1, s. 113-147. DOI: 10.1146/annurev-genom-083117-021320.
76. YANG, Han; REN, Shuling; YU, Siyuan; PAN, Haifeng; LI, Tingdong et al. Methods Favoring Homology-Directed Repair Choice in Response to CRISPR/Cas9 Induced-Double Strand Breaks. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, roč. 21, č. 18. DOI: 10.3390/ijms21186461.
77. ZHENG, Yan a CHOU, Stella T. Transfusion and Cellular Therapy in Pediatric Sickle Cell Disease. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2021, roč. 41, č. 1, s. 101-119. DOI: 10.1016/j.cll.2020.10.007.
78. ZHU, Youmin a HASSAN, Syed. Advances in CRISPR/Cas9. *BioMed Research International*. 2022, roč. 2022, s. 1-13. DOI: 10.1155/2022/9978571.