

НАСЛЕДСТВЕНИ РЕТИНАЛНИ ДИСТРОФИИ

СЪВРЕМЕННИ И БЪДЕЩИ ТЕРАПЕВТИЧНИ ВЪЗМОЖНОСТИ



д-р Йоанна Кънева,
доц. д-р Невяна
Велева, дм,
проф. д-р
Александър Оскар,
дм

Клиника по очни
болести, УМБАЛ
„Александровска“,
Катедра по
офтальмология,
МУ-София

НАСЛЕДСТВЕНИТЕ РЕТИНАЛНИ ДИСТРОФИИ (НРД) СА ХЕТЕРОГЕННА ГРУПА ЗАБОЛЯВАНИЯ, при които увреждането на зрителните функции и настъпващата инвалидизация на пациенти-те се дължат на прогресивна увреда и загуба на ретинални клетки. Големият набор от патологични механизми, участващи в развитието на ретиналната увреда, изисква гъвкавост в подхода при лечението ѝ и предприемането на разнообразни подходи в опита за подобряване на зрителната функция на пациентите. Независимо от изключително интензивно развиващите се технологии и наука, опциите за повлияване на тези заболявания все още са ограничени. На този етап усилията са насочени в три посоки, а именно генна терапия, трансплантация на стволови клетки и разработването на ретинални протези. Значителен прогрес във възможностите за повлияване на НРД се бележи в края на 2017 г., когато FDA, а през 2018 г. и ЕМА, одобряват първата генна терапия, приложима при пациенти с конгенитална амавроза на Leber и пигментен ретинит, дължащи се на биалелни мутации на RPE65 гена. В средата на 2023 г. се очаква и официалното одобрение на генната терапия за лечение на пациенти с херeditарна оптикопатия на Leber. В близките години предстои излизането на резултатите и от други клинични проучвания, като надеждите са, че все повече възможности не само за предотвратяване на прогресията, но и за лечение на наследствените ретинални дистрофии ще бъдат реализирани в ежедневната клинична практика.

се определя и от факта, че един вид дистрофия може да се предизвика от мутациите на различни гени, както и мутации на един и същи ген могат да доведат до развитието на различни НРД^[1-5]. Унаследяването най-често е моногенно – АД, АР или Х-свързано, като има описани случаи и на митохондриално или бигенно предаване.

Голямата генетична хетерогенност води и до голяма клинична вариабилност^[1-5]. В зависимост от времето на изява на първите симптоми НРД биват врогени (проявяващи се в ранна детска възраст) и придобити (в юношеска или ранна зряла възраст). Могат да имат стационарен характер или прогресиращ ход на протичане, както и да бъдат изолирани очни (несиндромни) или асоциирани системни (синдромни) заболявания. В зависимост от първично засегнатите клетки на ретината и съответно симптомите на пациентите, могат да се разделят в няколко големи групи:

1. Дистрофии с предимно засягане на пръчиците.
2. Дистрофии с предимно засягане на конусчетата.
3. Генерализирани дистрофии.
4. Витреоретинопатии^[3].
5. Наследствени оптикопатии.

В случаите, когато се проявяват

Наследствените ретинални дистрофии (НРД) са група заболявания, характеризиращи се с голяма клинична и генетична хетерогенност, които се дължат на директно или индиректно увреждане на невроепителните клетки на ретината – пръчици и конусчета^[1]. Макар всяко едно от заболяванията да се класифицира като рядко, честотата за цялата група е 1/2000–3000

гоуши, което определя НРД като една от най-честите причини за слепота, засягаща повече от 2 млн. човека по света. До този момент са описани над 20 различни нозологични единици и повече от 270 гена, чиито мутации водят до тяхното развитие^[2].

Освен големия брой гени, чиито мутации са причина за клиничната изява на различните НРД, генетичната хетерогенност на тези заболявания

Ключови думи:

наследствени ретинални дистрофии, генна терапия, стволови клетки, ретинални протези

В ранна детска възраст, те се характеризират с тежко засягане на зрителните функции, като нарушенията могат да бъдат стационарни или да прогресират до слепота още през първото десетилетие от живота на детето. По-късно проявяващите се ретинални дистрофии, винаги имат прогресиращ характер, като колкото по-късно се изявят първите клинични симптоми, толкова по-лека е клиничната картина и толкова по-дълго пациентите запазват „полезно“ зрение^[1-6]. Клиничната картина при различните НРД зависи от това кои клетки на ретината се засягат предилекционно. При увреждането на конусчетата на ретината (областта на макулата) оплакванията на пациентите са свързани с намаляване на зрителната острота, увреждане на цветното зрение, фотофобия, появата на нистагъм-макулни дистрофии (болест на Stargardt, дистрофия на Best), кон и кон-род дистрофии, дисхроматопсия, ахроматопсия. При поразяването на пръчиците (периферията на ретината) първите нарушения са свързани с оплаквания от затруднения и „слепота“ на тъмно, стесняване на зрителното поле – пигментен ретинит, конгенитална стационарна нощна слепота. При генерализираните НРД, чиито класически описан представител е конгениталната амавроза на Leber, още при първите изяви на болестта се наблюдава цялостно и тежко засягане на зрителните функции. В случаите с наследствени витреоретинопатии (фамилна ексудативна витреоретинопатия, синдром на Stickler) първа изява на заболяването може да бъде тоталното отлепване на ретината. В групата на НРД могат да се включат и наследствените оптикопатии, при които се наблюдава

първично засягане на ганглийните клетки на ретината, като най-честите заболявания в тази група са АД атрофия на зрителния нерв и хередитарната оптикопатия на Leber.

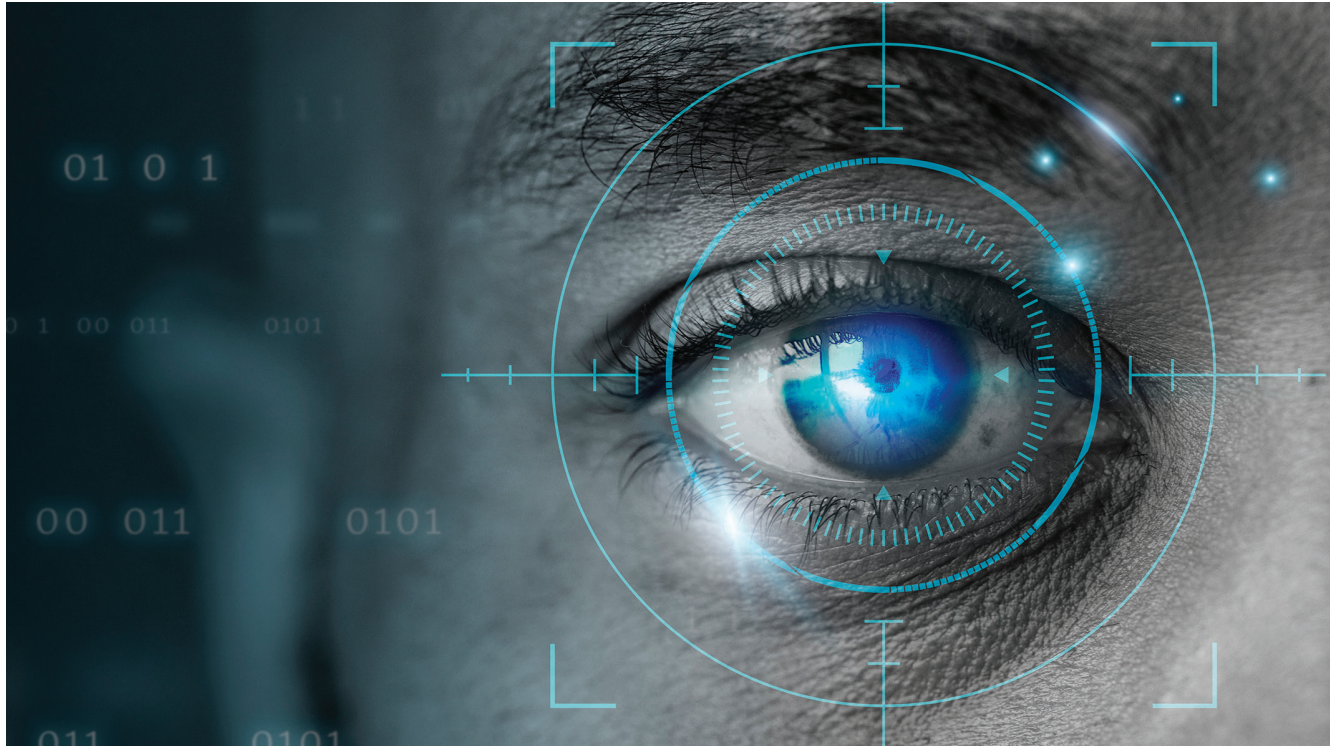
Окоето е един от „имуно-привилегированите“ органи в организма^[7]. Такива са всички тъкани и органи, в които чужди тъканни трансплантанти могат да преживяват неограничено дълго време, докато поставени в „имуно-непривилегировани“ участъци, биват поглочени на остра реакция на отхвърляне, медицирана от имунните защитни механизми. Окоето притежава ограничен набор от ефекторни имунни механизми, които имат най-малък потенциал да предизвикат масивно деструктивно възпаление при осъществяването на протективните механизми срещу дадени патогени. Регулацията на тези имунни механизми е от основно значение за безопасността на генния трансфер в окоето, защото един не толкова прецизно модулиран възпалителен отговор потенциално би увредил необратимо тъканите. Именно този специализиран отговор, развит от организма, прави окоето толкова добра цел за редица иновативни терапевтични подходи.

На този етап от достиженията на съвременната медицина усилията за лечение на НРД са насочени в три посоки – генна терапия, трансплантация на стволови клетки и разработването на ретинални протези.

Генната терапия е техника, която използва въвеждането в организма на генетичен материал (ДНК или РНК), чиято функция е да модифицира генната експресия с цел лечение или предотвратяване на развитието на дадено заболяване, дължащо се на конкретен генетичен ге-

фект^[8]. Този вид терапия работи по няколко различни механизма. При автосомно-рецесивните (АР) заболявания, където и двете копия на даден ген са мутирани, в резултат на което не се синтезира протеин или той е дефектен, се прилага генно заместване – доставяне на нормално копие на съответния ген, което води до синтеза на нормалния протеин. При автосомно-доминантните (АД) заболявания този метод не е приложим, тъй като в този случай имаме едно увредено копие на гена, което води до продукцията на мутирал протеин и едно копие, което продуцира нормален протеин. Тук се наблюдава т.нар. доминантно негативен ефект, при който „дивият тип“ и мутантният протеин си взаимодействат по такъв начин, че блокират нормалната функция на съответния протеин. В тези случаи се използва РНК-заглушаване, чиято функция е да предотврати мутирания ген да се транскрибира в мРНК или съответно на мутиралата мРНК да се транслира в протеин.

За транспортиране на съответния нуклеотиден сегмент в таргетния орган на помощ идват „Векторите“ – структури, чиято функция е пренос на терапевтичния генетичен материал директно в клетките^[9]. Използваните вектори са производни на вируси, като в процес на разработка са и невирусни вектори. Известни са четири основни типа вирусни вектори – аденовирусни, адено-асоциирани вирусни, лентивирусни и ретровирусни. Основните качества на всеки от тях, които ги правят приложими при разработването на генни терапии и ваксини, са тяхната безопасност, ниска токсичност, стабилност и клетъчна специфичност. Макар и с някои ограничения, на този етап най-пог-



ходящи за провеждане на генна терапия в окото са адено-асоциираните вируси (ААВ). Те са малки вируси с дълга и стабилна експресия^[9,10]. Техен недостатък е малкият им капацитет – могат да носят само до 5 килобази ДНК. Обикновено те са неинтегриращи вектори, което означава, че ДНК, която носят нормално, не навлиза в генома на клетката и ако векторът навлезе в деляща се клетка, терапевтичният ген няма да се копира при деленето на клетката и да се предаде в следващото поколение. Това би довело до намаляването на концентрацията му с времето и дори до изчезването му от организма. По тази причина ААВ се използват предимно в неделящи се клетки, каквито са клетките на ретината.

НРД са идеални кандидати за провеждането на генна терапия по редица причини – голяма част от тях са моногенни заболявания; ретината

е лесно достъпна, а нейната “имунна привилегированост” осигурява предпазването на вектора от имунните механизми и от системното му разпространение; необходима е ниска доза от медикамента, което е възможно поради директното приложение в мястото му на действие, както и относително малките размери на самото око^[11,12]. Основните пътища за приложение на генната терапия са субретиналното и интравитреалното инжектиране.

Първите опити за ретинален генен трансфер са осъществени при мишки с пигментен ретинит чрез субретинално инжектиране на аденовирусен вектор, натоварен със здрав ген, като резултатите са публикувани в края на миналия век^[13]. Следва период от две десетилетия, в който се провеждат редица клинични проучвания на различни колективи и компании, които завършват с неуспех. Едва към края на 20^{ме} години

на настоящия век медикаментът voretigene neparvovec-rzyl (Luxturna®) за първи път получава одобрение от регулаторните органи (2017 г. от FDA и през 2018 г. от EMA) за генна терапия на пациенти в САЩ и Европа^[14-16]. Препаратът представлява ААВ2, носещ здраво копие на RPE65 гена и се прилага при пациенти с билелни мутации на RPE65 гена и клиничната картина на конгенитална амавроза на Leber (LCA тип 2), тежка наследствена ретинална дистрофия с ранно начало и някои автозомно-рецесивни форми на пигментен ретинит. Клиничните проучвания на медикамента започват през 2007 г. и се радват на успехи още в началните фази, което води и до успешното регистриране на продукта 10 години по-късно. В момента субретиналното приложение на препарата се осъществява в специализирани центрове по света, при пациенти, които отговарят на изискванията

за провеждане на терапията. Такива са генетично доказаната биалелна RPE65 мутация и наличието на достатъчно на брой витални невроепителни клетки на ретината, върху които да може да повлияе медикаментът. Наблюдава се не само спиране на прогресията на заболяването, но и подобряване на зрителните функции. До момента в България има три деца, при които успешно е приложена тази генна терапия.

Успехът от приложението на *oretigene parargovex* в клиничната практика дава надеждата, че генната терапия ще има голямо бъдеще в лечението на НРД. Причина за този ентузиазъм е и фактът, че съвсем скоро (средата на 2023 г.) се очаква одобрението на нова генна терапия, този път на медикамент за лечение на херeditарна оптикопатия на Leber (LHON). Това е препаратът *lepadogene polargovex* за лечение на пациенти с LHON, дължаща се на точкова мутация (11778G>A) в митохондриалния ген MT-ND4, която е най-честата причина за развитие на заболяването^[17]. Той също използва рекомбинантен, неспособен на репликация едноверижен ДНК агено-асоцииран вирусен вектор за преносител на здраво копие на митохондриалния ген ND4^[18-20]. За разлика от Luxturna®, която се прилага субретинално, приложението в този случай е интравитреално.

Терапията със стволови клетки е една от широко проучваните методи за повлияване на дегенеративните очни заболявания^[21,22]. Стволовите клетки са функционално недиференцирани, незрели клетки с комплексна структура, която ги прави способни да се диференцират във всеки клетъчен тип в тялото. В зависимост от това в какви условия биват поставени, те могат да уве-

личават собствената си популация или да се диференцират в различни клетъчни типове и да генерират клетъчна популация от съответния тип. Тези им свойства обуславят потенциала им да регенерират тъканите и да възстановяват техните функции след увреждане.

Терапията със стволови клетки намира приложение при заболявания на роговицата и ретината. През 2015 г. ЕМА одобрява първата стволовоклетъчна терапия за лечение на очно заболяване – *Holoclar*, при лечение на лимбална стволовоклетъчна негостатъчност^[16]. Активната субстанция всъщност се състои от собствените корнеални и лимбални стволови клетки на пациента, които се размножават в лабораторни условия.

Ретиналните дегенерации са група основна група заболявания, които са обект на множество проучвания за възможностите за лечение със стволови клетки. Използват се две основни групи клетки – екзогенни на ретината, каквито са мезенхимните стволови клетки, невралните стволови клетки и ембрионални/индуцирани плурипотентни стволови клетки и ендогенни ретинални стволови клетки като Мюлерови, цилиоепителни и RPE стволови клетки^[23,24]. Те осъществяват регенеративното си действие по няколко начина. Първият се състои в замяна на увредените и загинали стволови клетки със здрави такива, които действат чрез директно заместване или чрез синтеза на невропротективни и невротрофични фактори, а другият механизъм е чрез регулиране на дегенерацията на ретиналните клетки и съдове посредством инхибиране на апоптозата и създаване на нови синапси в ретината^[21,22]. Трите основни ретинални клетъчни типа, чието заместване се целѝ, са ганглийните клетки,

пигментният епител и фоторецепторите. Оптималният път за приложение на клетъчната терапия зависи от механизма на действие – интравитреално при използване на невропротективните и трофични механизми, или субретинално при клетъчното заместване^[25,26]. Няколко проучвания са в клинична фаза и са съсредоточени основно върху използването на стволови клетки, култивирани *ex vivo* преди трансплантирането им – ембрионални, индуцирани плурипотентни и мезенхимни стволови клетки. Освен това, няколко клинични проучвания изучават възможността за директно инжектиране на стволово-клетъчни популации, изолирани от костен мозък или мастна тъкан^[27].

Ретиналната протеза или бионичното око представлява имплантируемо електронно устройство, проектирано така, че да предизвиква визуално усещане при пациенти, страдащи от заболявания, засягащи нормалната функция на ретината, но при интактни зрителен нерв и зрителен кортекс^[28]. В такъв случай се предполага, че възстановяване на зрението би могло да се постигне чрез създаване на устройства, които да получават и обработват навлизащия в окото светлинен стимул и след това да предават информацията под формата на електрически импулси към съхранените клетки по хода на зрителния път. На теория зрителни протези могат да се разработят за всяка част от зрителния път, включително и зрителния кортекс, но ретината е предпочитана най-вече поради лесната си достъпност.

Първата концепция, че електрическа стимулация може да предизвика зрително усещане или “фосфени”, е изказана от *Чарлс Ле Рой* през 1755 г., когато той установил, че пропус-

кането на електрически ток през очната повърхност на спял пациент води до възникването на субективно усещане за светкавица^[29]. Имплантирането на първите ретинални протези започва през 2002 г. във фаза I на клиничните проучвания за Argus I. Следващото поколение Argus II® е първото ретинално протетично устройство, одобрено от FDA за приложение при пациенти с крайни фази на ПР^[30].

Различните дизайни за ретинални протези могат да се категоризират според това къде в окоето се имплантира устройството и как то достига импулсите до ганглийните клетки^[30,31].

Пациентите с ретинални протези могат да виждат светлинни мотиви от монохроматични точки – фосфени. Качеството на полученото изображение зависи от множество фактори като броя на електродите/фотодиодите в импланта, системите за обработка на информацията и нюансите на сивото, които могат да бъдат идентифицирани от съответния пациент.

При микроелектродните системи образът се получава по следния начин – ако пациент погледне към чаша, камерата първо улавя изображението на чашата. След това изображението се обработва по формата на пиксели, които съответстват на разпределението и броя на електродите и отделен сигнал се изпраща до всеки от тях. По този начин пациентът получава едно пикселизирано изображение на обекта. Зрението, което се осигурява чрез ретиналните протези значително се различава от естествената перцепция и изисква обучение и продължителна практика за оптимизиране на ефекта за пациентите.

В зависимост от хирургичния пог-

ход се различават четири типа ретинални протези – епиретинални, субретинални, супрахороидални и интрасклерални протези^[32]. Имплантират се само в едното око. При епиретиналните протези електропроводната мрежа се разполага по вътрешната повърхност на ретиналните нервни влакна. Системата Argus II® използва 60-канална стимулираща епиретинална микроелектродна структура и е най-широко използваното устройство в световен мащаб с имплантирани над 350 пациенти^[33]. През май 2019 г. компанията производител съобщава, че повече няма да произвежда Argus II® и се съсредоточава върху развитието на кортикален имплант Orion. Други епиретинални устройства са IRIS II и EpiRet, които обаче също не са достъпни за приложение в момента. Освен ретинални протези в момента се работи активно и по развитието на кортикални протези^[34,35].

През последните години напредъкът в човешката генетика, клетъчната биология и генна терапия доведоха до фундаментални промени в традиционните терапевтични модели.

В процес на проучване са редици медикаменти и устройства, като в бъдеще специалните ще имат възможност за етиологично повлияване на генетични заболявания, както и приложението на високоспециализирани методи за подобряване на зрителната функция и съответно качеството на живот на пациентите с тежко зрително увреждане и слепота. ■

Книгопис:

- Chen TC, Huang DS, Lin CW et al. Genetic characteristics and epidemiology of inherited retinal degeneration in Taiwan. *npj Genom. Med.* 2021; 6, 16.
- Retinal Information Network <https://sph.uth.edu/retnet/home.htm>, 2020.
- Berger W, Kloeckener-Gruissem B, Neidhardt J. The molecular basis of human

- retinal and vitreoretinal diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2010; 29, 335-375.
- Traciewska AM, Kocyla-Karczmarewicz B, Rafalska A, et al. Non-syndromic inherited retinal diseases in Poland: Genes, mutations, and phenotypes. *Mol Vis.* 2021;27:457-465.
- Sahel JA, Marazova K, Audo I. Clinical characteristics and current therapies for inherited retinal degenerations. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;5(2).
- Велева H, Оскар А. Конгенитална амавроза на Лебер – най-мекката наследствена ретинална дистрофия. *Медица*, 2021; 10.
- Barker CF, Billingham RM. Immunologically privileged sites. *Adv. Immunol.* 1997. 25, 1-54.
- Alfred S Lewin; William W Hauswirth. Ribozyme gene therapy: applications for molecular medicine. 2001, 7(5), 0-228.
- Nussbaum, Robert L; McInnes, et al (2015). *Thompson & Thompson Genetics in Medicine*. Canada: ELSEVIER. 2015; p. 278. ISBN 978-1-4377-0696-3.
- Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol. Ther.* 2006 Sep;14(3):316-27.
- Davis JL, Gregori NZ, MacLaren RE, et al. Surgical technique for subretinal gene therapy in humans with inherited retinal degeneration. *Retina.* 2019;39 Suppl 1:S2-S8.
- Ochakovski GA, Bartz-Schmidt KU, Fischer MD. Retinal gene therapy: surgical vector delivery in the translation to clinical trials. *Front Neurosci.* 2017;11:174.
- Bennett J, Tanabe T, Sun D, et al. Photoreceptor cell rescue in retinal degeneration (rd) mice by in vivo gene therapy. *Nat Med* 1996;2:649 654
- <https://www.ema.europa.eu>
- <https://www.fda.gov>
- Russell S, Bennett J, Wellman J, et al. Efficacy and safety of voretigene neparovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomized, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2017;390(10097):849-860.
- Yu Wai Man P, Newman NJ, Carelli V, La Morgia C, Biousse V, Bandello FM, et al. Tsiel M and Sahel J A, for the LHON REALITY study group. Natural history of patients with Leber hereditary optic neuropathy—results from the REALITY study. *Eye (Lond).* 2021.
- Bonnet C, Augustins ES, Bénéit P, et al. The optimized allotopic expression of ND1 or ND4 genes restores respiratory chain complex I activity in fibroblasts harboring mutations in these genes. *Biochim Biophys Acta.* 2008.
- P. Yu-Wai-Man, N. J. Newman, V. Carelli, et al. Bilateral visual improvement with unilateral gene therapy injection for Leber hereditary optic neuropathy. *Sci. Transl. Med.* 2020. 12, eaaz7423.
- Newman, N.; Yu-Wai-Man, P.; Carelli, V. et al. The Phase III REFLECT Trial: Efficacy and Safety of Bilateral Gene Therapy for Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON)(P17-12.002). *Neurology* 2022, 98, 928.
- Zarbin M. Cell-Based Therapy for Degenerative Retinal Disease. *Trends Mol Med.* 2016;22:115-134.
- Siqueira RC. Stem cell therapy for retinal diseases: update. *Stem Cell Res Ther.* 2011;2:50.
- Ooto S., Akagi T., Kageyama R., et al. Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101:13654-13659
- Ahmad I., Tang L., Pham H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 270:517-521.
- Puertas-Neyra K, Usategui-Martin R, Coco RM, Fernandez-Bueno I. Intravitreal stem cell paracrine properties as a potential neuroprotective therapy for retinal photoreceptor neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res.* 2020; 15(9):1631-1638. doi:10.4103/1673-5374.276324
- Dimiz B, Thomas P, Thomas B, et al. Subretinal implantation of retinal pigment epithelial cells derived from human embryonic stem cells: improved survival when implanted as a monolayer. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54(7): 5087-5096.
- Więcek MP, Gosławski W, Grabowicz A, et al. Long-term effects of adjuvant intravitreal treatment with autologous bone marrow-derived lineage-negative cells in retinitis pigmentosa. *Stem Cells Int.* 2021;2021:6631921.
- Hadjinicolaou, A. E., Meffin, H., Maturana, M. I., Cloherty, S. L. & Ibbotson, M. R. Prosthetic vision: devices, patient outcomes and retinal research. *Clin. Exp. Optom.* 98, 395-410 (2015).
- Bloch E, Luo Y, da Cruz L. Advances in retinal prosthesis systems. *Ophthalmol Eye Dis.* 2019;11:1-16.
- Luo, Y. H.-L. & da Cruz L. The Argus(®) II Retinal Prosthesis System. *Prog. Retin. Eye Res.* 50, 89-107 (2016).
- Loewenstein JI, Montezuma SR, Rizzo JF & III. Outer retinal degeneration: An electronic retinal prosthesis as a treatment strategy. *Arch. Ophthalmol.* 122, 587-596 (2004).
- Ayton LN, Blamey PJ, Guymer RH, et al. First-in-human trial of a novel suprachoroidal retinal prosthesis. *PLoS ONE* 2014;9: e115239.
- Ayton LN, Barnes N, Dagnelie G, et al. An update on retinal prostheses. *Clin Neurophysiol.* 2020;131(6):1383-1398.
- Tehovnik EJ. Electrical stimulation of neural tissue to evoke behavioral responses *J. Neurosci. Methods* 1996; 65 1-17.
- Harvey BM, Dumoulin SO. The relationship between cortical magnification factor and population receptive field size in human visual cortex: constancies in cortical architecture *J. Neurosci.* 2011; 31: 13604-12.