

# Primjena genske terapije u liječenju sljepoće

---

Vrdoljak, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University of Split, Faculty of science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:592850>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-14**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Odjel za biologiju

Jelena Vrdoljak

**PRIMJENA GENSKJE TERAPIJE U LIJEČENJU SLJEPOĆE**

Završni rad

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Puizina

Rujan, 2020.

Ovaj rad, izrađen u Splitu, pod vodstvom prof. dr. sc. Jasne Puizine, predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnice biologije i kemije.

## IZJAVA

kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad s naslovom „Primjena genske terapije u liječenju sljepoće“ izradila samostalno pod voditeljstvom prof. dr. sc. Jasne Puizine. U radu sam primijenila metodologiju znanstvenoistraživačkog rada i koristila literaturu koja je navedena na kraju završnog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući navela u završnom radu na uobičajen, standardan način citirala sam i povezala fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

Studentica Jelena Vrdoljak

---

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Odjel za biologiju  
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

Završni rad

### Primjena genske terapije u liječenju sljepoće

Genskom terapijom uvodi se novi, funkcionalni gen u stanicu i organizam čovjeka kako bi se nadomjestio nedostatak funkcije postojećeg, često mutiranog gena te izliječila bolest, koja je nastala kao posljedica nedostatka tog proteina. Između ostalog, svoju je primjenu našla i u liječenju teških oštećenja mrežnice koja nastaju zbog mutacija nekoliko različitih gena. Oko je pogodno za gensku terapiju iz više razloga: Mrežnica je formirana od uređenih epitelnih slojeva koji olakšavaju ubrizgavanje i umetanje vektora u kojem se nalazi terapijski gen te zbog samog položaja i veličine oka. Bolesti mrežnice za koje klasična medicina nema lijek, a u kojih je genska terapija pronašla svoju primjenu su: *Leberova urođena amauroza (LCA)*, *Retinitis pigmentosa*, *koroideremija*, *akromatopsija*, Stargardtova bolest i starosna degeneracija makule. Jedna od trenutno dostupnih i iznimno učinkovitih genskih terapija za liječenje bolesti mrežnice poznata je pod komercijalnim nazivom Luxturna, koja je ujedno i prva genska terapija tog tipa koja je odobrena od strane Američke agencije za hranu i lijekove (FDA). Tijekom te terapije nadomješta se nedostatak proteina kojeg kodira gen *RPE65*. Još se mnoga ispitivanja u području genske terapije nalaze se u različitim eksperimentalnim i kliničkim fazama.

**Ključne riječi:** Genska terapija, mrežnica, sljepoća, slabovidnost *RPE65*, *Adeno-associated virus (AAV)*

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu

**Rad sadrži:** 21 stranicu, 8 grafičkih prikaza i 25 literarnih navoda

**Mentor:** Dr. sc. Jasna Puizina, redoviti profesor u trajnom zvanju

**Ocjenjivači:** prof. dr. sc. Valerija Dunkić, redovita profesorica

doc. dr. sc. Željana Fredotović, docentica

Rad prihvaćen: 22.9.2020.

## Basic documentation card

University of Split  
Faculty of Science  
Department of Biology  
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

B. Sc. Thesis

### Application of gene therapy in the treatment of blindness

The gene therapy introduces a new, functional gene into a human cell and organism to compensate for the lack of function of an existing, often mutated gene and to cure a disease caused by a lack of that protein. Among other things, it has found its application in the treatment of severe retinal damage caused by mutations in several different genes. The eye is suitable for gene therapy for several reasons: The retina is formed of arranged epithelial layers that facilitate the injection and insertion of a vector containing the therapeutic gene and due to the position and size of the eye. Retinal diseases for which classical medicine has no cure, in which gene therapy has found its application are: *Leber's congenital amaurosis (LCA)*, *Retinitis Pigmentosa*, *choroideremia*, *atromatopsia*, *Stargardt's disease* and *age-related macular degeneration*. One of the currently available and extremely effective gene therapies for the treatment of retinal diseases is known under the commercial name Luxturna, which is also the first gene therapy of this type approved by the US Food and Drug Administration (FDA). During this therapy, the lack of a protein encoded by the *RPE65* gene is compensated for. Many more trials in the field of gene therapy are in various experimental and clinical phases.

**Keywords** Gene therapy, retina, blindness, low vision, *RPE65*, Adeno- associated virus (AAV)

Thesis deposited in the library of Faculty of Science, University of Split

**Thesis consists of:** 21 pages, 8 figures and 25 references

Original language: Croatian

**Mentor:** Jasna Puizina, Ph.D. full Professor of Faculty of Science, University of Split

**Reviewers:** Valerija Dunkić, Ph.D. full Professor of Faculty of Science, University of Split  
Željana Fredotović, Ph.D

Thesis accepted: September 22, 2020



## Sadržaj

---

1. Uvod .....	1
1.1. Osnove genske terapije .....	2
1.2. Građa oka .....	4
2. Zašto je oko pogodno za gensku terapiju .....	7
3. Bolesti mrežnice koje uzrokuju sljepoću .....	8
3.1. Leberova urođena amauroza .....	8
3.2. Retinitis pigmentosa .....	12
3.3. Koroideremija .....	13
3.4. Akromatopsija .....	15
3.5. Stargardtova bolest .....	16
3.6. Starosna degeneracija makule .....	17
4. Zaključak .....	18
Literatura .....	19

## 1. Uvod

---

Procjenjuje se da broj ljudi svih dobnih skupina s oštećenjem vida iznosi 285 milijuna, od kojih je 39 milijuna potpuno slijepo. (WHO, 2010) Uzroci oštećenja vida mogu biti razni, genetika igra veliku ulogu, ali tu je i okolina. Za veliku većinu bolesti nema lijeka, ali genska terapija je i u ovom kao i u drugim područjima medicine našla svoju primjenu.

Nastala potkraj 20. stoljeća genska terapija se pokazala kao revolucionarno otkriće. Po prvi puta u povijesti postalo je moguće liječiti uzrok bolesti, a ne samo posljedicu kako se to prije radilo.

Cilj ovog završnog rada je ukratko opisati što je genska terapija, opisati građu oka, zašto je baš oko pogodno za gensku terapiju te opisati nasljedne bolesti mrežnice koje uzrokuju sljepoću, a kod kojih se primjena genske terapije pokazala učinkovito.

## 1.1. Osnove genske terapije

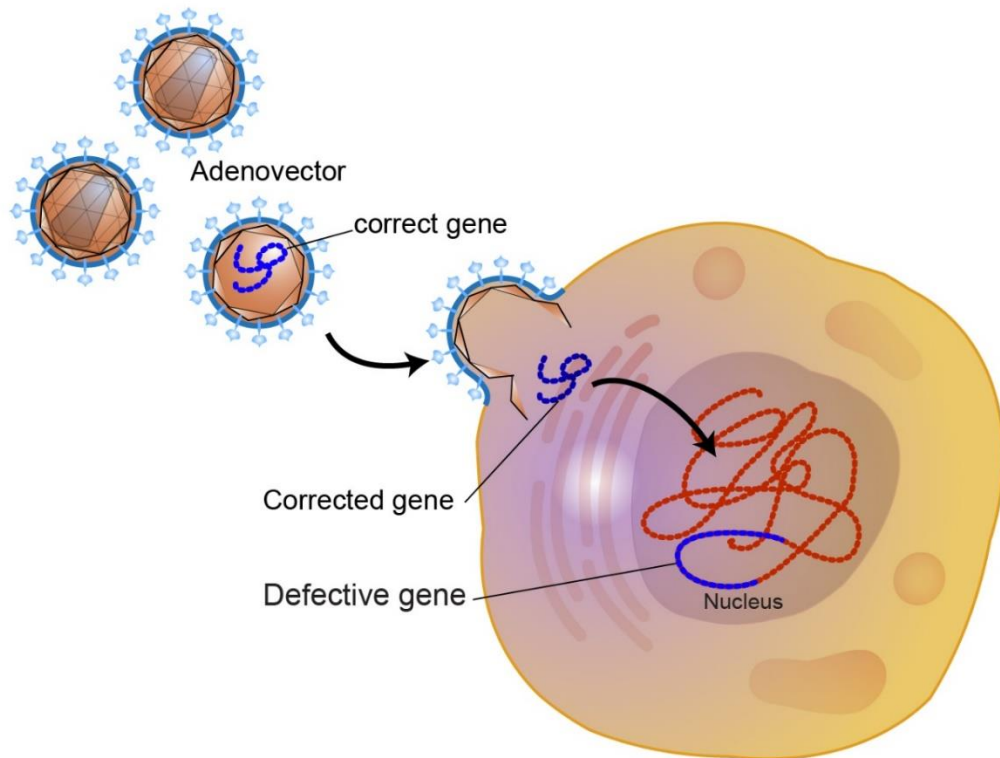
Genskom terapijom uvedi se novi, ispravni gen u stanicu kako bi se nadomjestilo nedostatak funkcije mutiranog gena, odnosno kompenzirala ili korigirala abnormalna funkcija postojećeg gena te izliječila bolesti. Prema tipu stanice genska terapija može biti somatska i embrionalna. U somatskoj genskoj terapiji odsječak DNA unosi se u diploidne tjelesne stanice, zbog toga se rezultat takve genetički izmijenjene stanice ne može prenositi s generacije na generaciju. Međutim, u embrionalnoj genskoj terapiji gdje se koriste jajne stanice i spermiji, genetička preinaka može se prenositi na slijedeće generacije. (U.N. National Library of Medicine, 2020)

Godine 1990. Martin Cline postao je prvi koji je pokušao gensku terapiju pomoću rekombinantne DNA. Prije toga, već je eksperimentalno uspio ubaciti strane gene (tj. dihidrofolat reduktazu i timidin kinazu) iz virusa *Herpes simplex* u matične stanice koštane srži miša, nadalje, uspio je pokazati da su se te modificirane stanice uspjele djelomično ponovno obnoviti. Prvi službeno odobreni klinički protokol za uvođenje stranog gena kod ljudi odobrio je *Recombinant DNA Advisory Committee (RAC)* u prosincu 1988. Taj je protokol imao za cilj korištenje tehnike označavanja gena (engl. „gene marking techniques“) za praćenje kretanja krvi koja se infiltrira u tumorske stanice u bolesnika s karcinomom. (Wirth i sur. 2013)

Da bi se gen mogao unijeti u stanicu za to je potrebno koristiti vektore, nosače gena koje se želi ugraditi u ciljne stanice. Postoje virusni i ne-virusni vektori. Virusni vektor je najučinkovitije sredstvo prijenosa gena za modificiranje određenog tipa stanice ili tkiva i njime se može manipulirati kako bi se eksprimirali terapijski geni. (slika 1) Trenutno se istražuje nekoliko tipova virusa kako bi se geni stavili u stanice kako bi se osigurala prolazna ili trajna ekspresija transgena. To uključuje adenoviruse (Ads), retroviruse ( $\gamma$ -retroviruse i lentiviruse), poxviruse, adeno-povezane viruse, bakuloviruse i virus *Herpes simpleks*. Izbor virusa za rutinsku kliničku uporabu ovisit će o učinkovitosti ekspresije transgena, lakoći proizvodnje, sigurnosti, toksičnosti i stabilnosti (Warnock i sur. 2011)

Virusni vektori razlikuju se prema: efikasnosti unošenja gena u stanični genom, te duljini i stabilnosti izražavanja tog gena, duljini DNA koju pomoću njih možemo ubaciti u stanični genom, tome da li zaražavaju stanice u diobi, one koje miruju ili obje kategorije, neki virusni vektori posjeduju i određenu tkivnu specifičnost, kao npr. HSV (virus *Herpes simplex*)

kojeg se koristi za ubacivanje gena u živčane stanice (preuzeto s: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Gene-Therapy> )

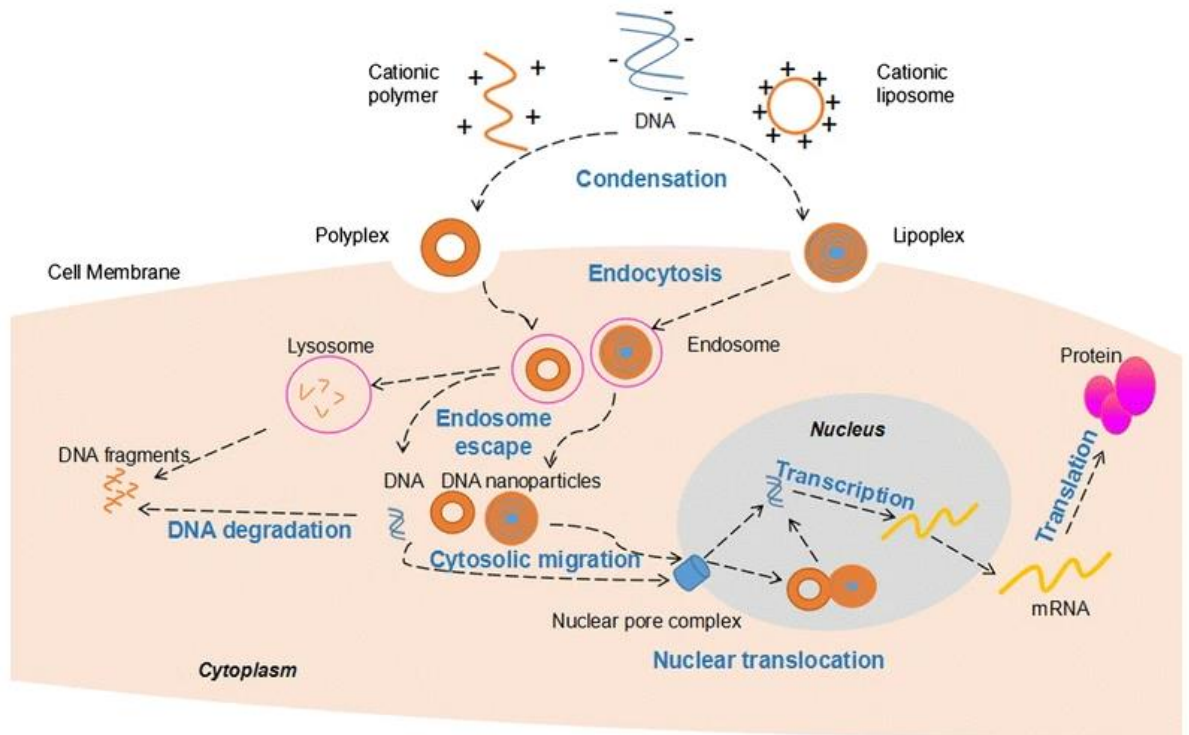


**Slika 1** Uvođenje zdravog gena u ciljane stanice putem genetički modificiranih virusa. Prethodno se iz genoma virusa izrežu geni koji čine virus opasnim za bolesnika, te u genom virusa uklopi genetski materijal koji žele dostaviti u stanicu. (preuzeto s: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Gene-Therapy> )

Ne-virusni vektori obuhvaćaju sve veći broj fizikalnih i kemijskih metoda sposobnih za isporuku gena u jezgre ciljnih stanica (Slika 2). Glavne fizikalne metode su mikroinjekcija, elektroporacija i balistička injekcija, magnetofekcija, sonoracija, optička transfekcija i lokalizirana hipertermija. Glavne kemijske metode su lipofekcija, polifekcija, kompleksiranje zlata i metode na bazi ugljika. Kombinirani pristupi za poboljšanje učinkovitosti transfekcije ili smanjenje imunološkog odgovora pokazali su veliko obećanje u širenju opsega nevirusne isporuke gena. ( Hong Sum i sur. 2018)

DNA se kondenzira interakcijom s kationskim polimerom ili se inkapsulira u kationski liposom da bi se stvorio polipleks ili lipopleks i endocitozom prolazi kroz staničnu membranu. Jednom kada se dogodi endosomski bijeg, kompleks se otpušta u citosol, a oslobođena DNA

transportira se u perinuklearno područje putem sustava mikrotubula. Nuklearna translokacija egzogene DNA može se postići prolaskom kroz kompleks nuklearnih pora u stanicama koje se ne dijele. Nakon ispravne transkripcije i translacije, stvaraju se ciljani proteini koji imaju biološke učinke (Wu i sur. 2018)

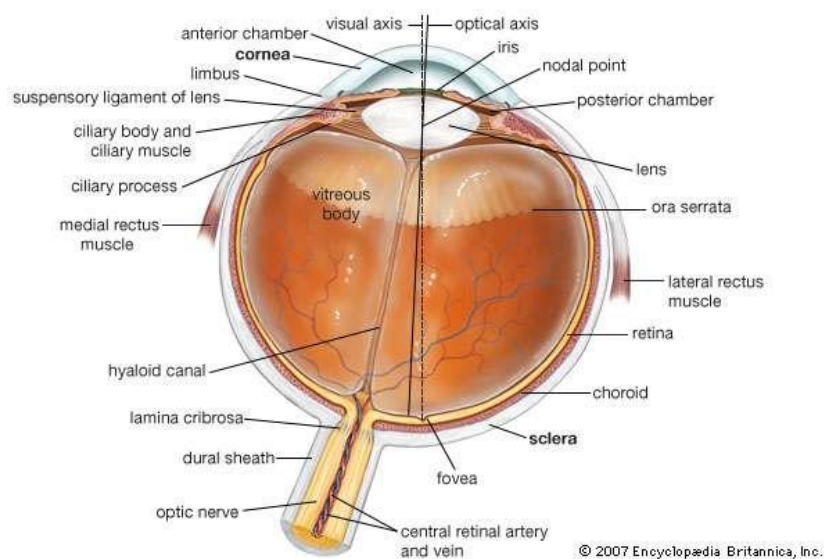


**Slika 2** Osnovni mehanizam ne-virusne isporuke gena putem polipleksa i lipopleksa. (Wu i sur.2018)

## 1.2. Građa oka

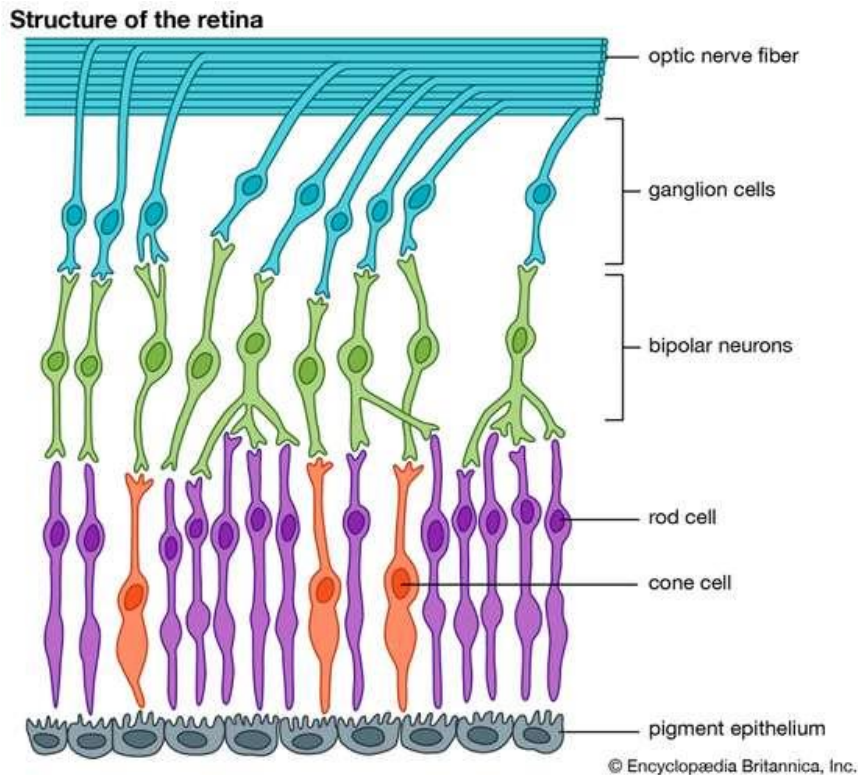
U čovjeka, oko je parni organ smješten u koštanoj očnoj šupljini (*orbita*). Sastoji se od očne jabučice i pomoćnih organa: vanjskih očnih mišića, suznoga uređaja, vjeđa i spojnice. Očna jabučica (*bulbus*) kuglasta je oblika, promjera oko 24 mm. Obavijena je trima ovojnicama. Vanjsku ovojnicu čini neprozirna tvrdo-elastična bjeloočnica (*sklera*), koja ima zaštitnu ulogu. Obuhvaća četiri petine očne jabučice, dok preostalu petinu čini prozirna rožnica (*korneja*). Srednja se ovojnica u stražnjem dijelu sastoji od žilnice (*korioideja*), koja obiljem krvnih žila prehranjuje oko. U prednjem dijelu ovojnice nalazi se prstenasti zaslon, šarenica (*iris*), koja u sredini ima otvor, zjenicu (*pupila*). Šarenica sadrži različit broj pigmentnih stanica, o čem ovisi njezina boja, a svojim mišićima širi ili sužava zjenicu propuštajući u oko

više ili manje svjetlosti. Između šarenice i žilnice nalazi se zrakasto (cilijarno) tijelo koje sadrži cilijarni mišić, što svojim radom čini očnu leću više ili manje ispuščenom i tako omogućuje akomodaciju oka pri gledanju na blizinu i daljinu. Cilijarni nastavci zrakastoga tijela luče očnu vodicu. (Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2020.)



**Slika 3** Horizontalni presjek ljudskog oka koji prikazuje glavne dijelove oka, uključujući zaštitni pokrov rožnice preko prednjeg dijela oka. (Perkins, 2020)

Unutar očnu ovojnicu čini mrežnica (*retina*), u kojoj se u više slojeva nalaze različite potporne i živčane stanice. Jedan od slojeva čine fotoreceptorne stanice, štapići i čunjići, koje sadrže vidne pigmente. Štapići služe za osjet svjetlosti i raspoznavanje pokreta. Ima ih oko 120 milijuna, a smješteni su većim dijelom na periferiji mrežnice. Čunjići služe za precizan vid, raspoznavanje oblika i boja. Prema vrsti vidnoga pigmenta razlikuju se tri vrste čunjića, a o njima ovisi raspoznavanje crvene, zelene i modre boje. Ima ih oko 6 milijuna, a smješteni su u središnjim dijelovima mrežnice. Napose su gusto raspoređeni u središnjoj jamici, koja je mjesto najoštrijega vida (žuta pjega). Blizu žute pjege nalazi se slijepa pjega, područje bez fotoreceptorne stanice, jer ondje iz oka izlaze živčana vlakna koja tvore očni živac (*nervus opticus*) te ulaze i izlaze mrežnične krvne žile.



Slika 4 Struktura mrežnice (izvor: (Perkins, 2020)

U fotoreceptornim stanicama zbiva se pretvorba svjetlosne energije (elektromagnetska zračenja između 400 i 750 nm) u kemijsku (razgradnjom vidnoga pigmenta), što izaziva bioelektrični potencijal koji se u obliku živčanoga impulsa prenosi vidnim živcem do vidnih središta u moždanoj kori. Očnu jabučicu ispunjavaju: prozirna leća, smještena iza šarenice (ima ulogu sabirne leće), potom očna vodica, smještena između šarenice i rožnice, te, iza leće, želatinozna staklovina, koje očnoj jabučici daju potrebnu napetost održavajući unutarnji očni (intraokularni) tlak. Prozirne strukture (rožnica, očna vodica, leća i staklovina) čine dioptrijski uređaj oka, koji lomi svjetlosne zrake usredotočujući ih na mrežnici. U svakom oku postoji 6 vanjskih očnih mišića, koji ga skladnim djelovanjem pokreću u svim smjerovima. Suzni uređaj oka sastoji se od suzne žlijezde, smještene u njegovu vanjskom gornjem kutu, i suznih odvodnih kanalića u unutar. donjem kutu. Na taj način suze prelaze preko cijele površine oka čisteći ju od prašine i bakterija, vlaže rožnicu čuvajući ju od isušivanja te otječu u nosnu šupljinu. Gornja i donja vjeđa (*palpebra*) štite oko i pomažu otjecanje suza; na njihovu rubu nalaze se trepavice. Nježna i prozirna spojnica (*konjunktiva*) oblaže unutar. površinu vjeđa i vidljivi dio očne jabučice (osim rožnice). (Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2020.)

## 2. Zašto je oko pogodno za gensku terapiju

---

Kao što je gore navedeno, genska terapija je postupak kojim se nova DNA ubacuje u stanice. Cilj te metode je ili ponuditi stanici gen koji joj nedostaje ili ne funkcionira, ili pružiti stanici gen koji bi mogao služiti u terapijske svrhe. Genska terapija korištena je za brojna tkiva i oštećene stanice, s promjenjivim uspjehom. U slučaju pružanja tretmana za bolesti mrežnice, mrežnica je iz mnogih razloga najbolja meta za gensku terapiju. Mrežnica je formirana od uređenih epitelnih slojeva koji olakšavaju ubrizgavanje i umetanje DNA vektora u kojem se nalazi terapijski gen u sve populacije očnih stanica. Uz to, sama fiziologija oka čini mogućim umetanje DNA u njega, primjenom relativno neinvazivnog pristupa.

Intraokularnom okruženju može se lako pristupiti. To se razlikuje od većine unutarnjih organa kojima se ne može lako pristupiti, pa stoga pristup genskoj terapiji za njih postaje nezgodan. Također treba imati na umu da je količina retinalnog tkiva mala u usporedbi s drugim visceralnim organima, što opet omogućuje učinkovit, ciljani pristup umetanju DNA vektora u stanice. Nadalje, krvno-retinalna barijera omogućuje izolaciju intraokularne okoline od imunološkog sustava, a to je važno, jer će vjerojatno kontrolirati pretjerane imunološke reakcije pokrenute primjenom stranih antigena. Konačno, relativno je lako pratiti djelotvornost liječenja genskom terapijom procjenom oštine vida pacijenta ili primjenom pristupa elektrofiziologije i optičke koherentne tomografije. (Samiy, 2014.)



## 3. Bolesti mrežnice koje uzrokuju sljepoću

---

Bolesti mrežnice su glavni uzrok nepovratne sljepoće kod ljudi. Takve bolesti mogu biti naslijeđene ili stečene tijekom života. Nasljedni poremećaji mrežnice pogađaju osobe svih dobnih skupina, a različite vrste napreduju različitim brzinama. Nasljedni poremećaji uzrokovani su mutacijama jednog ili više gena, tj. mutacije su moguće čak u 260 gena koji su odgovorni za normalan rad mrežnice. Međutim, mnoge takve bolesti su degenerativne, što znači da se s vremenom pogoršavaju. Najčešće bolesti mrežnice kod kojih je genska terapija pronašla svoju primjenu su: *Leberova urođena amauroza (LCA)*, *Retinitis pigmentosa*, *koroideremija*, *akromatopsija*, *Stargardtova bolest* i *starosna degeneracija makule*. Cilj genske terapije je ispraviti ili nadoknaditi neispravan gen (Samiy, 2014.)

U daljnjem tekstu donosim najčešće bolesti mrežnice, njihove simptome, kratak opis te kako genska terapija može pomoći pri liječenju.

### 3.1. Leberova urođena amauroza

Lebereova urođena amauroza (*Leber's congenital amaurosis, LCA*) je skupina nasljednih distrofija mrežnice koju karakterizira ozbiljan gubitak retinalnih i vizualnih funkcija rano u djetinjstvu s progresivnom degeneracijom stanične strukture mrežnice. Ti su poremećaji povezani s raznim oštećenjima oka, od kojih su najočitiiji abnormalni pokreti oka, poznati i kao *nistagmus*. Ostali simptomi uključuju spore reakcije zjenica i loše ili odsutne elektoretinografske reakcije u ranom životu. Kako bi se pružila točna dijagnoza bolesti, bilježe se elektoretinografski odgovori i svjetlosni refleksi zjenica. U slučaju LCA pojedinaca, oba parametra su nenormalna (Simonelli i sur.2010)

LCA se obično nasljeđuje kao autosomno recesivno svojstvo, a do sada su zabilježene mutacije u 15 različitih gena. Opisana je najmanje 13 vrsta Leberove urođene amauroze (označene redom LCA1-LCA13). Vrste se razlikuju po genetskom uzroku, obrascima gubitka vida i povezanim abnormalnostima oka. Bolest se javlja u 2 do 3 pacijenta na 100 000 novorođenčadi. Jedan je od najčešćih uzroka sljepoće kod djece. (Simonelli i sur.2010)

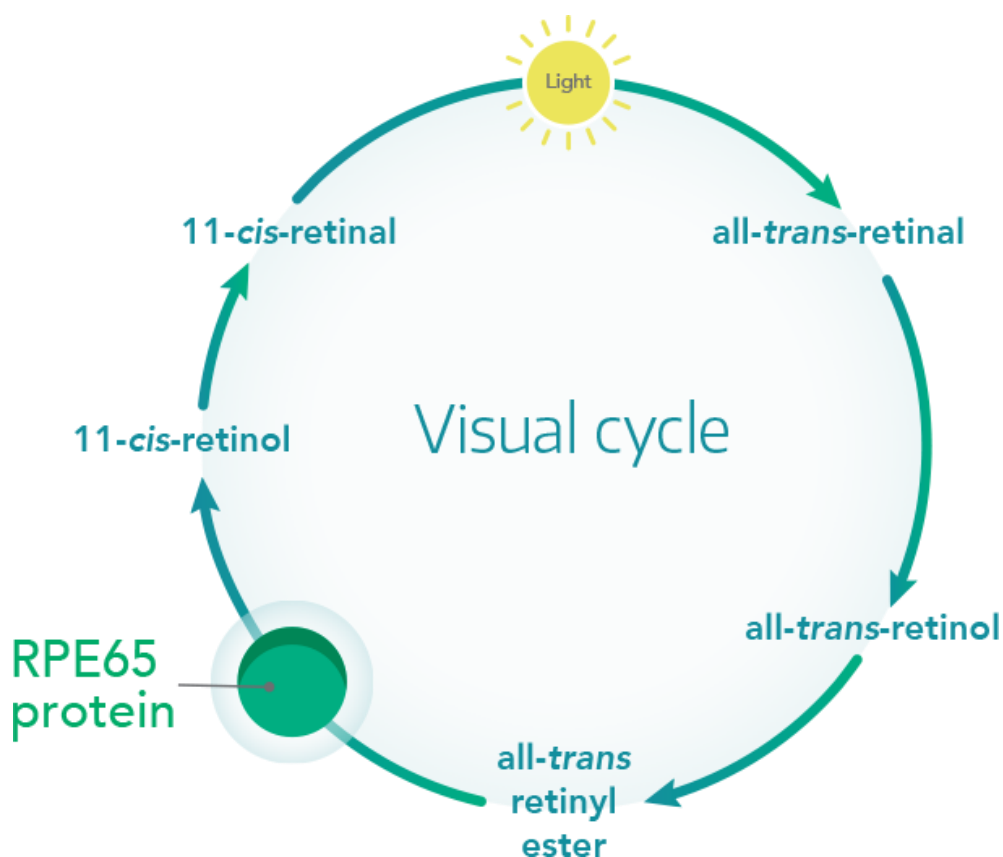
Mutacije bilo kojeg gena povezanog s Leberovom urođenom amaurozom remete razvoj i funkciju mrežnice, što rezultira ranim gubitkom vida. Mutacije u genima *CEP290*, *CRB1*, *GUCY2D* i *RPE65* najčešći su uzročnici poremećaja, dok mutacije u ostalim genima uglavnom čine manji postotak slučajeva. U oko 30 posto svih ljudi s Leberovom urođenom amaurozom uzrok poremećaja je nepoznat. (Simonelli i sur.2010)

Jedna od vrsta *LCA* bolesti je oblik *LCA2* koji je potaknut mutacijama u genu *RPE65*. Gen *RPE65* kodira protein velik 65 kDa koji je presudan za biokemijski put uključen u regeneraciju vidnog pigmenta kao rezultat izlaganja vanjskoj svjetlosti, koji se naziva vizualni ciklus. (Slika 5) Protein *RPE65* odgovoran je za aktivnost izomerhidrolaze u retinalnom pigmentnom epitelu, što dovodi do proizvodnje 11-cis-retinala iz svih trans-retinilestera. 11-cis-retinal prirodni je „ligand i kromofor opsina fotoreceptora smještenog na stanicama štapića i čunjića". (Sharif i Sharif, 2017)

Odsutnost 11-cis-retinala dovodi do nesposobnosti opsina da uhvate i pretvore svjetlost u električne reakcije koje posljedično pokreću pojavu vida. Stoga se očekuje da će takva odsutnost ključnog proteina uzrokovati trenutno i ozbiljno oštećenje funkcije vida. Ipak, kod bolesnika s *LCA2*<sup>1</sup>, kao i u modela *LCA2* na životinjama, dolazi do kašnjenja u histološkoj degeneraciji stanica mrežnice, iako pregledi ukazuju na to da su vidna sposobnost i elektrofiziološki odgovori bolesnika ozbiljno ugroženi. Pretpostavlja se da stanice čunjića mogu koristiti alternativni put koji se ne oslanja na *RPE65* izveden za pristup 11-cis retinalnom dehidrokromoforu. (Sharif i Sharif 2017)

---

<sup>1</sup> *Leber's congenital amaurosis tip 2*



**Slika 5** Vizualni ciklus je presudan u biološkoj pretvorbi svjetlosti u električne signale. Gen *RPE65* kodira protein RPE65. RPE65 je neophodan za metabolizam vitamina A u stanicama fotoreceptora.

Protein RPE65 nalazi se u stanicama pigmentnog epitela mrežnice (RPE) i pretvara sav trans-retinol u 11-cis-retinol, koji potom oblikuje 11-cis-retinal tijekom vizualnog ciklusa. **(LUXTURNA)**

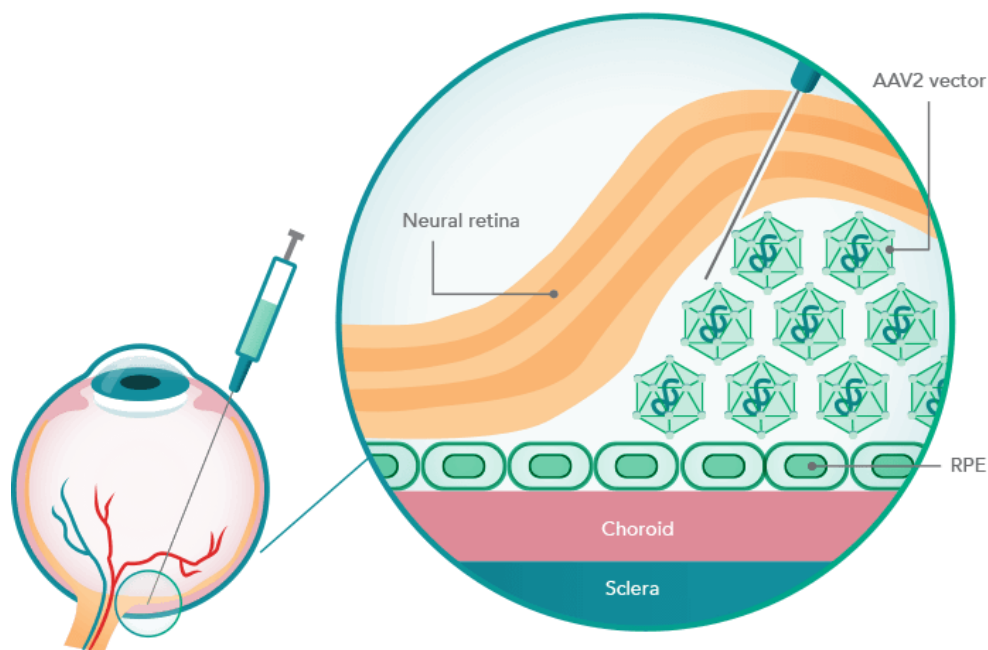
Iako su simptomi LCA-a izuzetno ozbiljni, zasad ne postoji učinkovito liječenje LCA uzrokovano genetskim nedostacima RPE65. Činjenica da djeca zadržavaju svoju vizualnu funkciju i da slikovne studije mrežnice pokazuju da je smrt fotoreceptorskih stanica relativno kasan događaj u progresiji bolesti, upućuje na to da bi nadomjesna genska terapija mogla biti valjana opcija. Takvi pristupi genskoj terapiji već su bili izuzetno uspješni u brojnim životinjskim modelima. Rekombinantni virusni vektori izvedeni iz nekih vrsta adenovirusa (među njima su i neki virusi prehlade) već su korišteni u modelima pasa, svinja i glodavaca LCA2. Rekombinantni adeno-povezani vektor AAV2.hRPE65v2 sadrži cDNA RPE65. Njegova *in vitro* injekcija u ciljne stanice potaknula je proizvodnju proteina RPE65. Stoga su rAAV vektori korišteni za prijenos funkcionalne retinoidne izomerohidrolaze, obnavljajući funkciju mrežnice sa značajnim vizualnim poboljšanjem. Jedna subretinalna injekcija s vektorom AAV2- RPE65 rezultirala je dugotrajnim poboljšanjem vizualnog kapaciteta u posebno odabranih pasmina pasa.

Studija koju su 2008. proveli Bainbridge i suradnici pokazala je utjecaj genske terapije RPE65 na bolesnike s LCA. Studija se temeljila na rezultatima tretmana mladih pacijenata u dobi između 17 i 23 godine koji su imali rani početak ozbiljne distrofije mrežnice koja je bila rezultat mutacija gena *RPE65*. Usvojena vrsta genske terapije uključivala je rekombinantni virusni vektor izveden iz adenovirusa serotipa-2, koji se naziva tgAAg76. Za kodiranje sekvence cDNA korišten je fragment od 1400 parova baza ugrađen u taj vektor. Transkripcija i promotor gena *RPE65* završavaju se nakon poliadenilacijskog signala goveđeg hormona rasta. Nakon vitrektomije, unaprijed određena količina rekombinantnog virusnog vektora ubačena je kroz subretinalnu kanilu izravno u subretinalni prostor u jednom oku. Studija je pokazala pozitivne rezultate, U jednog od bolesnika primijećeno je dosljedno poboljšanje mikroperimetrije, kao i perimetrija prilagođena tamnom. Posebno opaženo poboljšanje referentne oštine vida i u eksperimentalnoj i u kontrolnoj skupini. Nadalje, vidljiva pokretljivost oka pacijenta kao odgovor na nisku razinu svjetlosti značajno se poboljšala (Simonelli i sur.2010)

Luxturna je komercijalni naziv za gensku terapiju oka, koju su razvili Spark Therapeutics i Dječja bolnica u Philadelphiji (slika 6). U oko pacijenta se uz pomoć virusnih čestica isporučuju funkcionalne kopija gena *RPE65* (Fischer, 2017). Tu, prvu gensku terapiju za nasljedni poremećaj mrežnice, u SAD-u je odobrila FDA <sup>2</sup>, a također je odobrena za uporabu i u Europskoj uniji.

---

<sup>2</sup> Food and Drug Administration – Američka agencija za hranu i lijekove



**Slika 6 Dostava gena RPE65** LUXTURNA koristi adeno-povezani virusni vektor serotip 2 (AAV2) za prijenos funkcionalne kopije gena *RPE65* u stanice retinalnog pigmentnog epitela (RPE) kako bi nadoknadio mutaciju *RPE65* gena (izvor: <https://luxturnahcp.com/how-LUXTURNA-works/mechanism-of-action/>)

### 3.2. Retinitis pigmentosa

*Retinitis pigmentosa (RP)* odnosi se na heterogenu skupinu nasljednih poremećaja koje karakterizira gubitak funkcije stanica mrežnice, ponajprije u perifernoj mrežnici. Retinitis pigmentosa može imati različitu težinu, dob početka i način nasljeđivanja. Rijedak je poremećaj koji se prenosi s roditelja na dijete. Samo 1 od 4000 osoba oboli od ove bolesti. (Daiger i sur. 2013)

Općenito, RP karakterizira polako progresivan gubitak noćnog vida (nyctalopia) zajedno sa sužavanjem vidnog polja. U kasnijim fazama bolesti zahvaćena je središnja oštrina, što može dovesti do dubokog gubitka vida. Tipične abnormalnosti fundusa uključuju voštano bljedilo vidnog živca, refleksi nalik tapetalu koji proizlazi iz promjena u pigmentnom epitelu mrežnice (RPE), sužavanja periferne vaskularne mrežnice i promjena koštane spikule u srednjoj perifernoj mrežnici. Postoji više gena koji, kada su mutirani, mogu uzrokovati fenotip te bolesti. Obrasci nasljeđivanja RP identificirani su kao autosomno dominantni, autosomno recesivni, X-povezani i stečeni majkom (mitohondrijski), a ovise o specifičnim mutacijama RP gena prisutnim u roditeljskoj generaciji. Godine 1989. identificirana je mutacija gena za

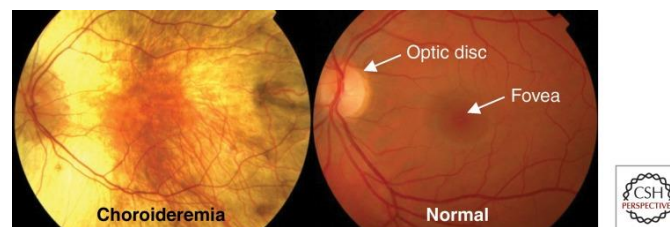
rodopsin, *RHO*, pigment koji igra bitnu ulogu u kaskadi vizualne transdukcije omogućujući vid u uvjetima slabog osvjetljenja. Gen rodopsin kodira glavni protein vanjskih segmenata fotoreceptora. (Bhattacharya i Chakarova, 2013)

Mutacije u tom genu najčešće se predstavljaju kao pogrešne (engl. *missense*) mutacije te izazivaju abnormalno savijanje (engl. *foldng*) proteina rodopsina, a najčešće slijede autosomno dominantne obrasce nasljeđivanja. (Bhattacharya i Chakarova, 2013)

Otkrića gena za rodopsin, *RHO*, identificirano je više od 100 mutacija *RHO*, što čini 15% svih vrsta degeneracije mrežnice i približno 25% autosomno dominantnih oblika RP. X-vezani obrasci nasljeđivanja RP-a trenutno se identificiraju s mutacijama šest gena, a najčešće se javljaju na određenim lokusima u genima *RPGR* i *RP2*. I za tu bolest nema lijeka, ali genska terapija se čini najbolje rješenje. (National Eye Institute, 2019)

### 3.3. Koroideremija

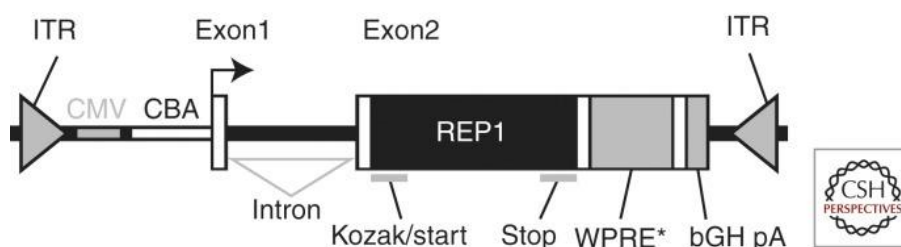
Koroidermija (engl. *Choroidermia*) je trenutno neizlječiva recesivna X-vezana degenerativna bolest mrežnice i žilnice, koju je prvi opisao Mauthner 1872. godine. Stopa oboljelih je 1:50 000, a sjeverna Finska ima najveći prijavljeni postotak oboljelih u svijetu. Gubitak noćnog vida započinje u prvom desetljeću života i napreduje postupnim gubitkom perifernog vida i pravnom sljepoćom do petog desetljeća. Koroideremija je uzrokovana mutacijama gena *CHM*, koji je bio jedan od prvih gena identificiranih uporabom pozicijskog kloniranja. *CHM* kodira Rab escort protein 1 (REP1) (Barnard i sur.2015)



**Slika 7** Fotografija fundusa pacijenta s uznapredovalom koroideremijom. Oko pacijenta (lijevo) u usporedbi s normalnim okom (desno). U oku koroideremije postoji zaostali otok zdravog tkiva u središnjoj makuli i fovei. Izvor: (Barnard, i sur.2015)

Ohrabrujuće je da nekoliko specifičnih molekularnih i kliničkih značajki čini koroideremiju idealnim kandidatom za liječenje genskom terapijom. Da bi genska terapija djelovala, genetski materijal (DNA / RNA) treba sustav isporuke (vektor), a u kliničkim ispitivanjima kao što je već rečeno uobičajeno je koristiti modificirani virus za prijenos gena u stanice. *Adeno-associated virus (AAV)* trenutno je popularan vektor za klinička ispitivanja, posebno za očnu gensku terapiju. Važno pitanje je količina genetskog materijala koji se može staviti u svaku virusnu česticu. To je poznato kao *kapacitet* ili *ograničenje pakiranja*, a za AAV vektore smatra se da je <5 kb jednolančane DNA. Iako se taj kapacitet smatra malim i potencijalnim ograničenjem upotrebe AAV-a, više je nego dovoljno uključiti puni kodirajući slijed gena *REP1* (1,9 kb), uz istovremeno omogućavanje prostora za odabir promotora i ostalih regulatornih elemenata. (Wu. i sur.2010)

Ključno je pitanje može li virusni vektor učinkovito ciljati i prenositi DNA (transducirati) određene vrste stanica i tkiva koja trebaju biti tretirana. Postoji mnogo različitih podtipova AAV, a svaki ima malo različite sekvence DNA i proteine kapside na svojoj vanjskoj ljusci (serotipovi). Ti serotipovi imaju različit stanični tropizam; oni preferencijalno ciljaju određene tipove stanica unutar određene vrste domaćina. Mnogi AAV vektori učinkovito ciljaju neurone, ali dokazano je da samo AAV serotip 2 transducira i fotoreceptore i RPE nakon subretinalne injekcije u neljudskih primata. Stoga se čini da je AAV2 dobar izbor, jer i štapičasti fotoreceptori i RPE stanice trebaju biti ciljane za zamjenu REP1 kod koroideremije. U sloju fotoreceptora čini se da AAV2 pretežno cilja štapičaste umjesto čunjastih stanica (Barnard i sur.2015)



**Slika 8** Shematski prikaz vektora AAV2 / 2-REP1 koji se koristi za gensku terapiju koroideremijom. ITR, AAV2 invertirani terminali se ponavljaju; CMV, element za pojačavanje citomegalovirusa; CBA, promotor kokošji  $\beta$  aktin (Barnard i sur. 2015)

Dobivena su potrebna financijska i regulatorna i etička odobrenja za započinjanje ispitivanja genske terapije za koroideremiju. Nakon razdoblja upisa i početnog ispitivanja, prvo je liječenje provedeno u listopadu 2011. Sve u svemu, kliničko ispitivanje je procijenilo učinke vektora AAV2 .REP1 u 12 muških bolesnika s kliničkim fenotipom koroideremije i potvrđenom molekularnom dijagnozom null mutacija<sup>3</sup> u genu koji kodira REP1. Koroideremija predstavlja niz izazova za gensku terapiju. Liječenje se mora provoditi kada je struktura mrežnice relativno netaknuta (tj. prije velikog gubitka stanica) i kada se još uvijek zadržava „dobar“ fovealni vid. Potencijalni rizici su značajni, jer isporuka vektora uključuje odvajanje fovee u bolesnika s dobrom oštrinom vida, iako ako se ne pruži nikakav oblik liječenja, vid će na kraju biti izgubljen zbog trajne degeneracije. Iako nema prekliničkih dokaza da je REP1 toksičan i prisutan je u gotovo svim stanicama s jezgrom u pacijenata koji nemaju koroideremiju, moguće je da bi pretjerana ekspresija REP1 mogla imati štetan učinak na stanice mrežnice, posebno na funkcionalne fotoreceptore. Uz to, ovo je prvo ispitivanje genske terapije za degeneraciju mrežnice koje posebno cilja stanice fotoreceptora (u pokusima za RPE65-LCA2, stanice RPE bile su primarna meta). (Barnard i sur. 2015)

**Rezultati:** Pacijenti koji nisu primili gensku terapiju ostali su neliječeni i trajno su gubili područje mrežnice i oštrinu vida tijekom svog života, kao što se očekivalo zbog napredovanja bolesti koroideremije. Genska terapija to je u velikoj mjeri spriječila u tretiranoj kohorti. Očekivano, liječenje u mlađoj dobi i lakšem zdravstvenom stanju ostvarilo je najveću korist za pacijenta prema procjeni QALY<sup>4</sup>-a. (Halioua-Haubold i sur.2019)

### 3.4. Akromatopsija

Akromatopsija je autosomna recesivna bolest mrežnice koja uključuje gubitak funkcije čunjića i pogađa približno 1 od 30 000 osoba. Utvrđeno je da su mutacije u tri gena primarni uzroci akromatopsije: *CNGB3*, *CNGA3* i *GNAT2* (Pang i sur.2013.)

Sva tri gena kodiraju ključne komponente fototransdukcijske kaskade u konusnim fotoreceptorima. *GNAT2* kodira  $\alpha$  podjedinicu G-proteina transducina koji se aktivira

---

<sup>3</sup> Null mutacija: Mutacija (promjena) gena koja dovodi do toga da se on ne transkribira u RNA i / ili ne prevede u funkcionalni proteinski proizvod

<sup>4</sup> Utjecaj gubitka vidne funkcije povezan s koroideremijom tijekom vremena procijenjen je pomoću *quality-adjusted life years (QALY)*, mjere utjecaja bolesti na kvalitetu života pacijenta (Halioua-Haubold i sur. 2019)



konusnim rodopsinima; *CNGA3* i *CNGB3* kodiraju podjedinice A3 i B3 kanala cikličkog nukleotida (CNG) koji posreduje svjetlosni odgovor u čunjićima (Tränkner i sur.2004.)

Klinički su prvi znakovi akromatopsije u novorođenčadi prisutnost nistagmusa, drhtanje očiju i fotofobija što se dokazuje škiljenjem pri jakom svjetlu. (Pang i sur. 2013.)

**Liječenje sljepoće za boje kod majmuna:** Istraživači su koristili gensku terapiju za obnavljanje vida za boje kod dva odrasla majmuna koji nisu mogli razlikovati crvenu i zelenu nijansu od rođenja - podižući nadu u izlječenje sljepoće za boje i drugih poremećaja vida kod ljudi. Otprilike 1 od 12 muškaraca nema ili crveno ili zeleno osjetljive proteine fotoreceptora koji su normalno prisutni u stanicama mrežnice koje osjećaju boju ili čunjićima. Slično stanje pogađa sve muške majmune. Sljepoća za boje u majmuna nastaje jer puni vid u boji zahtijeva dvije verzije gena opsin, koji se prenosi na X kromosom. Jedna verzija kodira za fotoreceptor koji detektira crveno, a druga za fotoreceptor koji detektira zeleno. Kako muški majmuni imaju samo jedan X kromosom, oni nose samo jednu verziju gena i neizbježno su slijepi za crveno-zelenu boju. Sličan nedostatak objašnjava najčešći oblik dikromatske sljepoće za boje kod ljudi. Manje ženki pati od tog stanja jer imaju dva X kromosoma i često nose obje verzije gena opsina. Neitz i njegovi kolege (2010. god.) predstavili su ljudski oblik gena za otkrivanje crvene boje u virusni vektor i ubrizgali virus iza mrežnice dvaju mužjaka majmuna - jednog nazvanog Dalton u čast britanskog kemičara Johna Daltona, koji je bio prvi da bi opisao vlastitu sljepoću za boje 1794. a drugi nazvanog Sam. Zatim su istraživači procijenili sposobnost majmuna da pronađu mrlje u boji na pozadini sivih točaka osposobljavajući ih da glavama dodiruju mrlje u boji na ekranu, a zatim ih nagrađuju sokom od grožđa. Nakon 20 tjedana, sposobnost razlikovanja boja majmuna dramatično su se poboljšale te nije došlo do nikakvih neželjenih pojava. (Dolgin, 2009)

### 3.5. Stargardtova bolest

Stargardtova bolest (STGD) najčešća je nasljedna makularna distrofija i najčešći uzrok gubitka vida u mladih ljudi. U većini slučajeva (90–95%) bolest se nasljeđuje kao autosomno recesivno svojstvo i povezana je s mutacijama gena *ABCA4* specifičnog za fotoreceptore (koji kodira transporter koji veže ATP i koji je uključen u čišćenje klijetke retinoida).

Ispitivanja koncepta na miševima *Abca4* pokazala su da je subretinalna primjena LV vektora koji nosi humani gen *ABCA4* povezana sa smanjenom akumulacijom A2E, ispravljenom razinom lipofuscina i poboljšanom morfologijom pigmentnog epitela mrežnice. Na temelju tih nalaza, prvo kliničko ispitivanje za liječenje STGD-a zasnovano na genima prešlo je u studije na ljudima. (Dalkara i sur.2016)

Trenutno je u tijeku rad sa SAR422459 na Institutu za oči Casey, Sveučilištu za zdravlje i znanost Oregona (Portland, OR) i Nacionalnoj očnoj bolnici Quinze-Vingts (Pariz, Francuska). Do sada nisu zabilježeni ozbiljni štetni događaji povezani s razinom doze 1 ili načinom primjene. (Dalkara i sur.2016)

U novije vrijeme dvostruki AAV sustavi također su uspješno primijenjeni u donošenju rješenja za gensku terapiju za Stargardtovu bolest. Subretinalna isporuka *ABCA4* putem optimiziranih DNA-nanočestica također je rezultirala trajnom ekspresijom transgena i značajnom strukturnom i funkcionalnom korekcijom u *Abca4* u miševa, što sugerira relevantan alternativni pristup za dostavu gena *ABCA4* (Dalkara i sur.2016)

### 3.6. Starosna degeneracija makule

Starosna degeneracija makule (AMD) najčešći je uzrok oštećenja vida kod starijih osoba. AMD čini 90% sljepoće povezane s AMD-om kod ovih pacijenata. (Dalkara i sur.2016)

Većina sadašnjih tretmana AMD ima za cilj spriječiti koroidalnu neovaskularizaciju isporukom antiangiogenih čimbenika. Ovi spojevi inhibiraju vaskularni endotelni faktor rasta A (VEGF-A), za koji se smatra da je odgovoran za rast i povećanu propusnost novih krvnih žila. Kako je AMD složena bolest, nije se smatrala vjerojatnim kandidatom za gensku terapiju. (Dalkara i sur.2016)

Međutim, uspjeh VEGF antagonista, koji su zahtijevali čestu ponovnu primjenu, i mogućnost dugoročne ekspresije antiangiogenih molekula putem ekspresije posredovane AAV-om izazvali su zanimanje. U dva trajna klinička ispitivanja faze I ispituju se faktor izveden iz pigmentnog epitela (PEDF) i topiva Fms-slična tirozin kinaza 1 (sFLT) kao potencijalni kandidati za liječenje identifikatora AMD-a (Dalkara i sur.2016)

## 4. Zaključak

---

Hoćemo li ikada u budućnosti doći do toga da svaka osoba ima normalan, zdrav vid, da promatra svijet bez naočala, kontaktnih leća i ostalih pomagala teško je reći. Koliko god bila u teoriji jednostavna i na prvi pogled izvrsna ideja za liječenje teških nasljednih bolesti za koje nema lijeka, genska terapija je složena tehnika koji je još u razvoju, proces koji zahtjeva skupe instrumente i ogromno znanje i vještinu znanstvenika i liječnika. Koliko ideja o izlječenju ljudi djelovala idealno tu je mnoštvo prepreka koje je potrebno savladati, jedna od važnih prepreka je i novac, primjerice trenutna cijena genske terapije za jedno oko u SAD-u košta nekoliko stotina tisuća dolara. U ovom radu prikazani su samo neki rezultati različitih eksperimenata, većina ih se nalazi u ranim fazama kliničkih ispitivanja, ali neki rezultati već postoje, a svakako mjesta za napredak ima.

## Literatura

---

- Barnard, A. R., Groppe M., MacLaren, R.(2015) Gene Therapy for Choroideremia Using an Adeno-Associated Viral (AAV) Vector. Cold Spring Harbor Laboratory Press 5(3):a017293.
- Bhattacharya, S., Chakarova, C. (2013). Retinitis Pigmentosa. U Brenner's Encyclopedia of Genetics 2nd Edition, 199-203
- Daklara, D., Goureau, O., Marazova, K., Sahel, J (2016) Let There Be Light: Gene and Cell Therapy for Blindness. Human Gene Therapy, 27(2):134-147
- Dalger, S.P., Sullivan, L., Bowne, S. (2013), Genes and mutations causing retinitis pigmentosa Clinical Genetics, 84 (2), 132-141
- Dolgin, E. (2009). Colour blindness corrected by gene therapy, *Nature*. Dostupno na: <https://www.nature.com/articles/news.2009.921>
- Fischer, A. (18. 12. 2017). *U.S. Food & Drug Administration*. FDA approves novel gene therapy to treat patients with a rare form of inherited vision loss: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-novel-gene-therapy-treat-patients-rare-form-inherited-vision-loss> (Preuzeto: 10.9.2020.)
- Halioua-Haubold, C., Jolly, J.K., Smith, J. A., Pinedo-Villanueva, R., Brindley, D.A., MacLaren, R. (2010) Potential lifetime quality of life benefits of choroideremia gene therapy: projections from a clinically informed decision model. *Eye*, 33, 1215–1223
- Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2020.* (n.d.).. 2020. Oko: <https://enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=44922> (Preuzeto:9.9.2020.)
- LUXTURNA.* (n.d.). Get to know RPE65 <https://luxturnahcp.com/id-appropriate-patients/rpe65-gene/> (Preuzeto:9.9.2020.)
- Candotti, F.(n.d.). Gene Therapy, *National Human Genome Research Institute*.: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Gene-Therapy> (Preuzeto: 9.9.2020)
- National Eye Institute.* (10. 7 2019). Retinitis Pigmentosa: <https://www.nei.nih.gov/learn-about-eye-health/eye-conditions-and-diseases/retinitis->

[pigmentosa#:~:text=Retinitis%20pigmentosa%20\(RP\)%20is%20a,of%20side%20\(perip  
heral\)%20vision.](#) (Preuzeto: 10. 9 2020)

Pang, J., Alexander, J., Lei, B., Deng, W., Zhang, k., Li, Q., Chang B., Hauswirth, W. (2013),  
Achromatopsia as a Potential Candidate for Gene Therapy. *Retinal Degenerative  
Diseases*, 664: 639-646

Perkins, E. S. (17. 8. 2020). Human Eye – Anatomy, *Encyclopædia Britannica*  
<https://www.britannica.com/science/human-eye/The-retina> Preuzeto 9.9. 2020

Samiy, N. ( 2014.). Gene Therapy for Retinal Diseases. *Journal of Ophthalmic & Vision  
Research*, 9 (4), 506-509.

Simonelli, F., Maguire, A., Testa, F., Pierce, E., Mingozzi, F., Bencicelli, J., Rossi. S., Marshall,  
k., Banfi, S., Surace, F., Sun, F., Redmond, T., Zhu, X., Shindler, K., Ying, G., Ziviello, G.,  
Acerra, C., Wright, J., Wellman McDonnell, J., High, K., Bennett, j., Auricchio,  
A.(2010) Gene Therapy for Leber's Congenital Amaurosis is Safe and Effective  
Through 1.5 Years After Vector Administration. *Molecular therapy : the journal of the  
American Society of Gene Therapy*, 18 (3) 643-650

Sum C.H., Shortall S.M., Wong S., Wettig S.D. (2018) ). Non-viral Gene Delivery. *Experientia  
Supplementum*, 110, 3-68

Tränkner, D., Jäggle ,H., Kohl, S., Apfelstedt-Sylla, E., Sharpe, S., Kaupp, B., Zrenner, E., Seifert,  
R., Wissinger, B. (2004) Molecular Basis of an Inherited Form of Incomplete  
Achromatopsia. *The Journal of Neuroscience*, 24 (1) 138-147

*U.N. National Library of Medicine.* (17. 8 2020). How does gene therapy work?:  
<https://ghr.nlm.nih.gov/primer/therapy/procedures> (preuzeto: 8.9.2020)

*U.S. Congress, Office of Technology Assessment.* (1984). Human gene therapy – A background  
paper: [https://books.google.hr/books?id=FxGjBqEL-  
3kC&pg=PA45&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.hr/books?id=FxGjBqEL-3kC&pg=PA45&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false) (preuzeto:7.9.2020.)

Warnock, J., Daigre,C., Al-Rubeai, M. (2011) ). Introduction to viral vectors. *Methods in  
molecular Biology*, 737:1-25.

Sharif, W., Sharif, Z. (2017). Leber's congenital amaurosis and the role of gene therapy in  
congenital retinal disorders. *international Journal of Ophthalmology* 10(3), 480–484.

WHO. (2010). Global data on visual impairment:

<https://www.who.int/blindness/publications/globaldata/en/#:~:text=Globally%20the%20number%20of%20people,are%2082%25%20of%20all%20blind.> (Preuzeto 10.. 9. 2020)

Wirth, P. Y.-H. ( 2013). History of gene therapy. *Gene*, 525, 162-169.

Wu, P., Chen, H., Jin, R., Weng, T., You, C., Zhang, L., Wang, X., Han, C. (2018) Non-viral gene delivery systems for tissue repair and regeneration. *Journal of Translational Medicine*, 16, 29.

Wu, Z., Yang, H., Colosi, P. (2010) Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging. *Molecular Therapy* 18 (1) 80-86.