

VILNIAUS UNIVERSITETAS
MEDICINOS FAKULTETAS

Baigiamasis darbas

Tinklainės distrofijų genų terapijos galimybės ir perspektyva
Gene therapy opportunities and perspective in retinal dystrophies' treatment

Studentas/ė (vardas, pavardė), grupė: **Kamilis Kobeckis** VI kursas, 7 gr.

Katedra/ Klinikos kurioje ruošiamas ir ginamas darbas
Ausų, nosies, gerklės ir akių ligų klinika, Klinikinės medicinos institutas

Darbo vadovas

Dr. Rasa Strupaitė-Šileikienė

(pedagoginis vardas, mokslo laipsnis, vardas, pavardė)

Konsultantas (jei yra)

(pareigos, vardas, pavardė)

Katedros arba Klinikos vadovas

Prof. Eugenijus Lesinskas

(pedagoginis vardas, mokslo laipsnis, vardas, pavardė)

2023 m.

Studento elektroninio pašto adresas: kamilis.kobeckis@gmail.com

SANTRAUKA:

Paveldimos tinklainės distrofijos yra santykinai reta grupė genetinių sutrikimų, kurie lemia progresuojančią tinklainės degeneraciją, lydinčią iki aklumo, pacientams keliančio daug sunkumų ir iššūkių kasdieniame gyvenime. Šiuo metu yra atrasta virš 250 genų, lemiančių paveldimas tinklainės distrofijas, kurioms taip pat yra labai būdingas genetinis ir klinikinis heterogeniškumas. Genų terapija yra daug žadantis metodas gydyti paveldimas tinklainės distrofijas ir pažanga genomo sekvenavimo technikose paskutiniaisiais dešimtmečiais leidžia ne tik diagnozuoti ir prognozuoti ligas ir jų eigą, tačiau taip pat yra svarbus elementas atrandant būdus gydymo kūrimui ir vystymui. Nors, dėl savo anatominių ir funkcinių ypatybių, tinklainė yra palankus audinys genų terapijai, vis dar yra nemažai iššūkių sėkmingą terapinį poveikį priešklinikiuose gyvūnų modeliuose suteikti ir išpildyti žmonių klinikiuose tyrimuose. Dėl to reikia daugiau tyrimų, kad būtų optimizuoti nauji gydymo būdai ir terapinės strategijos, užtikrintas saugumas bei efektyvumas žmogaus organizme. Ši apžvalga aptaria tinklainės distrofijų kompleksiškumą ir pabrėžia naują pažangą molekulinėje diagnozėje, genų terapijoje paveldimoms tinklainės distrofijoms. Neseniai patvirtintas pirmas genų terapijos produktas Voretigenas neparvovekas (Luxturna), skirtas mutacijų *RPE65* gene sukeltiems sutrikimams gydyti - dažniausiai Lėberio paveldimai amaurozei ir kai kuriems pigmentinio retinito atvejams – leidžia pristabdyti pacientų ligos progresavimą ir pagerinti regėjimą, o taip pat yra svarbus pasiekimas, kuris praneša apie naują erą paveldimų tinklainės distrofijų gydyme.

Inherited retinal dystrophies are a group of relatively rare genetic disorders that cause progressive degeneration of the retina, leading to vision loss, which causes lots of difficulties and challenges to patients in everyday life. There are found over 250 disease genes associated with inherited retinal dystrophies, for which genetic and clinical heterogeneity is common. Gene therapy is a promising approach for treating inherited retinal dystrophies, and advances in genome sequencing techniques in last decades have allowed not only to diagnose and prognose the disease but also to identify the way for development of new treatments. Although, due to its unique anatomical and functional characteristics, the retina is a favorable tissue for gene therapy, there are still challenges in translating the approach from preclinical animal trials to human clinical trials. Therefore, more research is needed to optimize these treatments and ensure their safety and efficacy in humans. This review discusses the complexity of retinal dystrophies and highlights recent progress in molecular diagnosis, gene therapy for inherited retinal dystrophies. Recently, the first gene therapy product that is

approved is voretigene neparvovec-rzyl (Luxturna), which is used for disorders caused by mutations in gene *RPE65* - Leber congenital amaurosis and some cases of retinitis pigmentosa – allows to halt the progress of the patient's disease and improve visual acuity and also, it is a significant achievement that signals the start of a new era in the treatment of inherited retinal dystrophies.

RAKTAŽODŽIAI: paveldimos tinklainės distrofijos, pigmentinis retinitas, genų terapija, CRISPR/Cas9, genų redagavimas, Lėberio paveldima amaurozė, virusiniai vektoriai, nevirusiniai vektoriai.

Inherited retinal dystrophies, retinitis pigmentosa, gene therapy, CRISPR/Cas9, gene editing, Leber hereditary amaurosis, viral vectors, non-viral vectors.

IVADAS:

Paveldimos tinklainės distrofijos yra heterogeninė skirtingų akių ligų grupė, su kurių keliamais dideliais iššūkiais pasaulyje susiduria 1 iš 3000 žmonių (virš 2 milijonų žmonių) pasaulyje. (1) Pacientai, turintys paveldimas ligas, kaip pigmentinis retinitas ar choroideremija, dažnai patiria laipsnišką regėjimo praradimą tamsoje ir prieblandoje bei regėjimo lauko susiaurėjimą. Kiti, sergantys, pavyzdžiui, Lėberio paveldima amauroze yra akli jau gimus ar netenka regėjimo labai ankstyvame amžiuje. (2) Gydomo nebuvimas ir labai reikšmingas gyvenimo kokybės sumažėjimas, siejamas su šiomis ligomis, skatina medikų ir mokslininkų bendruomenės ieškoti naujų ir inovatyvių sprendimų bei technologijų siekiant padėti pacientams sergantiems šiomis ligomis – juos gydyti ar lėtinti ligos progresavimą. Dėl pažangių genų ir jų pataloginių mutacijų nustatymo galimybių, genų terapija yra daug žadantis ir perspektyvus paveldimų tinklainės distrofijų gydymo būdas. Taip pat akių palankios imunologinės ypatybės (3), tokios kaip – prieinamas ir neinvazyvus vaizdų išsaugojimas ir chirurginės intervencijos su inovatyviomis technologijomis, mažas tinklainės dydis, lemiantis nedidelius terapinius vaistų kiekius, tinklainės-kraujo barjeras, limfagyslių nebuvimas, lemia gerą akių toleranciją genų terapijai. (4) Ši literatūros apžvalga aptaria paveldimas tinklainės distrofijas, jų žinomas priežastis, atrandamas patalogines mutacijas bei esamą genų terapijos taikymą joms gydyti, naujų metodų vystymą ir terapijos efektyvumo gerinimą bei dėl to kylančius iššūkius ir perspektyvas ateityje.

LITERATŪROS ŠALTINIŲ ATRANKOS STRATEGIJA:

Literatūros apžalgai paieška atlikta 2022-2023 m., naudojant PubMed ir Vilniaus universiteto virtualios bibliotekos duomenų bazes. Informacijos buvo ieškoma Elsevier

leidyklos, Amerikos Oftalmologų akademijos oficialiame tinklalapiuose. Pavadinime ir santraukoje (Title/Abstract) buvo ieškoma šių terminų ir jų derinių: „tinklainės distrofijos“ (retinal dystrophies), „genų terapija (gene therapy)“, „pigmentinis retinitas“ (retinitis pigmentosa), „neprogresuojantis naktinis aklumas) (congenital stationary night blindness); trumpiniai: „RD“ , „ERG“, „NNA“. Atvejų aprašymai ir straipsniai ne anglų kalba buvo atmesti. Peržiūrėtos santraukos ir atmesta su tema nesusijusi literatūra. Iš atrinktos literatūros peržiūrėti pilno teksto straipsniai.

Detalesniam įvertinimui buvo atrinktos literatūra ir studijos, publikuotos nuo 1992 iki 2023 metų, kurios pateikia įvairias tinklainės degeneracijas sukeliančių ligų aprašymus, genetinių tyrimų ir ligos variantų rezultatus ir išvadas, paveldimumą, gydymo, klinikinių išeigų palyginimą ir perspektyvas. Literatūros apžvalga atlikta remiantis tiek atskirų studijų, tiek jau atliktų sisteminių ir literatūros apžvalgų rezultatais.

KLINIKINIS BŪKLĖS APRAŠYMAS:

Paveldimos tinklainės distrofijos (PTD) yra grupė sutrikimų, kurie labiausiai pažeidžia tinklainės pigmentinio epitelio – fotoreceptorių kompleksą ir gyslainės kapiliarus ir taip sukelia regėjimo sutrikimus. Dažniausia PTD yra pigmentinis retinitas. Paveldimos tinklainės ligos yra viena dažniausių aklumo priežasčių 15-45 metų žmonių tarpe. (5) Kai kurios distrofijos linkusios pasireikšti ankstyvoje vaikystėje, tuo tarpu kitos pasireiškia tik vėlesniuose amžiaus tarpsniuose. Pacientams su tinklainės distrofija turėtų būti atliktas genetinis ištyrimas, siekiant nustatyti PTD sukėlusį geną, kadangi daug mutacijų gali sukelti tokį patį fenotipą (genetinis heterogeniškumas), taip pat ir skirtingi fenotipai gali būti nulemti to paties geno (fenotipinis heterogeniškumas). Su paveldimomis tinklainės retinopatijomis yra siejama daugiau nei 250 genų. Ligą sukeliančių genų identifikavimas leistų atrinkti pacientus, kuriems galėtų būti naudinga genų terapija ar patekimas į genų terapijos klinikinius tyrimus. (6) Dažniausi klinikiniai simptomai yra sutrikęs spalvų matymas, blogas matymas tamsoje, periferinio vaizdo sutrikimai ir laipsniškas regos blogėjimas iki visiško aklumo progresuojančiose būklėse. (7) Klinikiniam įvertinimui svarbu įvertinti: periferinį regos lauką, spalvinį matymą, regos elektrofiziologiją (ERG tyrimas), optinės koherentinės tomografijos vaizdus. (7)

REGOS LAUKO TYRIMAS

Dominuojant lazdelių fotoreceptorių funkcijos sutrikimui periferinio matymo praradimas yra ankstyviausias ligos požymis. Iš pradžių, regos lauko susiaurėjimas yra mažas, tačiau laikui bėgant progresuoja iki tunelinio matymo. Matymo pokyčiai dažniausiai būna simetriški

abejose akyse. Progresuojančiose ligose, kaip pigmentinis retinitas, dažnas regos lauko vertinimas yra būtinas, ypač jei pacientas, pavyzdžiui, vairuoja.

Dominuojant kūgelių fotoreceptorių funkcijos sutrikimui periferinio vaizdo susiaurėjimas sutinkamas retai ir išlieka stabilus metams bėgant. Taigi, jei neturime periferinio matymo sutrikimo, galime svarstyti apie diagnozes, kaip pigmentinis retinitas su kūgelių-lazdelių progresavimu arba kūgelių-lazdelių distrofija. Regos lauko sutrikimai kūgelių-lazdelių distrofijose prasideda paracentrinuose regionuose tarp 5 ir 30 laipsnių nuo fiksacijos, o periferija ištraukia vėlesnėse stadijose.

SPALVINIS MATYMAS

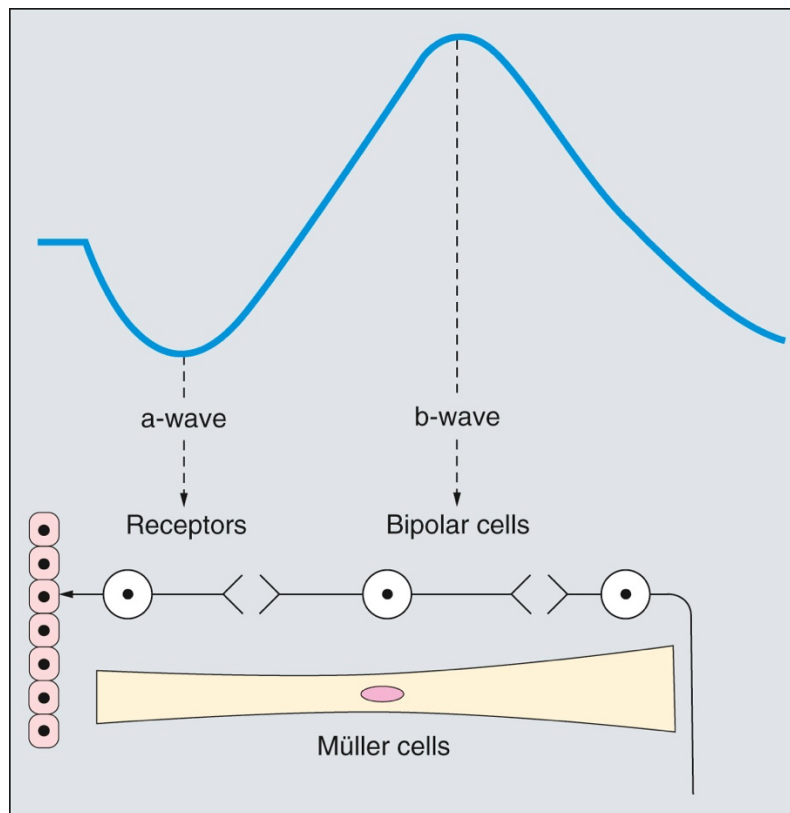
Pigmentiniu retinitu sergantys pacientai dažniausiai išlaiko gerą spalvinį matymą, kol neišsivysto pažengusios ligos stadijos ir yra pažeidžiami kūgeliai. Dažniausiai kūgeliai pažeidžiami, kai regos aštrumas yra žemiau 0,5. Spalvinio matymo sutrikimai dažnesni, kai dominuoja kūgelių pažeidimas.

ELEKTROFIZIOLOGIJA

Regos elektoretinografijos (ERG) tyrimas matuoja tinklainės elektrinį aktyvumą.

Pakankamai stimuliuojant atitinkamo intensyvumo šviesa, jonai (dažniausiai natrijs ir kalcis) judėdami iš arba į ląstelę generuoja potencialą. Šių reiškinių registravimas atliekamas tarp aktyvaus elektrodo, kontaktuojančio su ragena arba apatinio voko oda ir atskaitos elektrodo. Potencialai yra pateikiami vaizdine forma ir normos atveju ERG yra dažniausiai bifazė: a banga – pirmasis, negatyvus rageninis signalas, sugeneruotas fotoreceptorių; b banga – lėtesnis teigiamas ir didelės amplitudės signalas – nors ir generuojamas Miulerio ir bipolinių ląstelių, jis priklauso nuo funkcionuojančių fotoreceptorių ir jo dydį lemia fotoreceptorių vientisumas; c banga – trečias, neigiamas signalas, generuojamas tinklainės pigmentinio epitelio ir fotoreceptorių. ERG tyrimai taip pat turi savo potipius, pagrindiniai jų – pilno lauko ir daugiažidininis. Pilno lauko ERG sudaroma iš penkių registravimų stimuliuojant visą tinklainę, kad būtų vertinta bendra tinklainės būklė, tačiau lokalios patologijos gali likti neaptiktos. Pirmieji trys – aptinkami po 20 minučių tamsinės adaptacijos (skotopinė ERG), o likusios dvi po 10 minučių adaptacijos ryškioje difuzinėje šviesoje (fotopinė ERG). Tiriant vaikus gali būti sudėtinga įgyvendinti tamsos adaptacija 20 minučių, todėl gali būti naudojama prieblandos šviesa (mezopinė ERG), kad būtų iššauktas lazdelių atsakas į silpno intensyvumo baltos arba mėlynos šviesos stimulus. Skotopinės ERG metu vertinamas lazdelių atsakas ir lazdelių ir kūgelių atsakas. Fotopinės ERG metu vertinamas kūgelių atsakas su vienu ryškios šviesos blyksniu – registruojamos a ir b bangos, o vėliau - izoliuotas kūgelių atsakas apšviečiant 30 Hz šviesos mirgėjimu, į kurį lazdelių neatsako, taip išgaunama

b bangos amplitudė ir implicitinis laikas (trukmė nuo stimulo pradžios iki b bangos piko). Daugiažidininė ERG yra metodas, kuris sukuria topografinį tinklainės funkcijos žemėlapi pagal fotoreceptorių tankumą tinklainėje.



1 paveikslas. Elektroretinogramos komponentai ir kilmė. (6)

Pilno lauko ERG yra jautrus objektyvus testas tinklainės funkcijai identifikuoti ir reikšmingai prisidėti prie diagnozės nustatymo. Ankstyvose pigmentinio retinito stadijose, stebimi sumažėję skotopiniai lazdelių ir kombinuoti atsakai. Progresuojant ligai, fotopiniai atsakai yra paveikiami ir galiausiai išnyksta. ERG taip pat yra kertinis tyrimas kūgelių ar kūgelių-lazdelių distrofijoms diagnozuoti. ERG būdingas sumažėjęs fotopinis ir 30Hz mirgėjimas su pertraukomis. Vėliau, ligai progresuojant sumažėjęs ir skotopinis atsakas. Tačiau, jei skotopinis atsakas mažėja ankstyvose ligos stadijose – galima numanyti pigmentinį retinitą. Skiriamasis bruožas tarp achromatopsijos ir mėlynos spalvos monochromatizmo yra, kad pastarajame yra išgaunamas signalas su mėlynos spalvos blykste geltoname fone. Lėberio paveldimai amaurozei būdinga ypatingai nuo normos nukrypęs, išsiskiriantis atsakas ERG tyrime. ERG taip pat yra labai svarbus diferencijuojant tarp pigmentinio retinito nuo kitų sutrikimų, kaip, pavyzdžiui, kūgelių-lazdelių distrofija. Kūgelių-lazdelių distrofijos atveju, stebimas atsako sumažėjimas kūgelių ERG ir ne toks didelis atsako sumažėjimas lazdelėse.(7)

OPTINĖ KOHERENTINĖ TOMOGRAFIJA

Optinė koherentinė tomografija suteikia vertingos informacijos diagnozei ir būklės pokyčiams vertinti pigmentiniame retinite stebimi tinklainės sluoksnių suplonėjimai, ypač išoriniai jos sluoksniai. Plonėjimas progresuoja link geltonosios dėmės ir linkęs neplisti geltonosios dėmės sluoksniuose iki pažengusių ligos stadijų.(8) Optinė koherentinė tomografija (OKT) taip pat naudinga aptinkant cistine makulos edemą ir epiretalinę membraną. Tai leidžia išvengti fluorescencinės angiogramos cistinei makulos edemai aptikti. Neprogresuojančiam naktiniam aklumui būdinga OKT yra be pokyčių ir su normaliu dugno vaizdu. Pacientams su pakitusiu dugnu (*fundus albipunctatus*) būdingi hiperreflektyvūs depozitai, jie yra stebimi tinklainės pigmentiniame epitelyje, taip pat yra matomi ir kliniškai.(9) OKT achromatizmo atvejuose gali rodyti skirtingus pokyčius – nuo nutrūkusio vidinio ar išorinio receptorių segmento subfovealiniame regione iki hiperreflektyvios ertmės kūgelių sluoksnyje ir foveos hipoplazijos kai kuriais atvejais.(10)

LIGOS MECHANIZMAI IR PATOLOGIJA

Egzistuoja dviejų tipų tinklainės fotoreceptoriai:

- Lazdelės – jų yra daugiausia vienetų (120 milijonų) ir jie yra tankiausiai išsidėstę vidurinėje periferinėje tinklainės dalyje. Jie labiausiai jautrūs blyškiai šviesai ir yra atsakingi už naktinį, judėjimo pojūčio ir periferinį matymus. Jei lazdelių disfunkcija atsiranda anksčiau nei kūgelių arba yra labiau pažengusi nei kūgelių – ji pasireiškia prastu naktiniu matymu (niktalopija) ir periferinio lauko praradimu.
- Kūgeliai – jų yra mažiau nei lazdelių (6 milijonai) ir jie yra susitelkę tinklainės duobutėje. Kūgeliai yra jautriausi ryškiai šviesai ir dienos šviesai, spalvų regėjimui, centriniam matymui. Kūgelių disfunkcija lemia prastą centrinį matymą, spalvoto vaizdo sutrikimus (dischromatopsiją) ir kartais sutrikdo regėjimą dienos šviesoje (hemeralopija).

Paveldimų tinklainės distrofijų klasifikacija:

Priklausomai nuo paveiktų fotoreceptorių tipo, tinklainės distrofijos gali būti suskirstytos į lazdelių arba kūgelių distrofijas, pagal dominuojančią fotoreceptorių pažeidimą į lazdelių-kūgelių ir kūgelių-lazdelių distrofijas. PTD gali būti izoliuotos – požymiai pasireiškia tik tinklainėje, arba sindrominės – kaip platesnio sutrikimo, paveikiančio ir kitus organizmo audinius, dalis, taip pat būna sporadinės arba šeiminės.(6,7)

Šeiminiuose atvejuose paveldimumas gali būti klasifikuojamas į:

- Autosominį dominantinį
- Autosominį recesyvinį;
- Su X chromosoma asocijuotą;(6,7)
- Mitochondrinį
- Digeninį.

Pagrindinės tinklainės distrofijų sukeliančios ligos:

Lazdelių ir lazdelių-kūgelių distrofijos:

- Pigmentinis retinitas (*retinitis pigmentosa*);
- Neprogresuojantis naktinis aklumas;

Kūgelių ir kūgelių-lazdelių distrofijos:

- Kūgelių ir kūgelių-lazdelių distrofija;
- Achromatopsija

Generalizuotos nesindrominės tinklainės distrofijos:

- Lėberio paveldima amaurozė
- Choroideremija

Pigmentinis retinitas(*retinitis pigmentosa*):

Pigmentinis retinitas (PR) yra grupė skirtingos kilmės sutrikimų, kurie lemia laipsnišką regos mažėjimą. Ši liga, taip pat dar žinoma kaip paveldima tinklainės distrofija, paveikia apie 1 iš 5000 žmonių pasaulyje, tai yra, dažniausiai iš visų paveldimų tinklainės ligų.(11) Ši liga dažniausiai paveikia abi akis. Nepaisant pavadinimo kilmės, kurios galūnė indikuoja tinklainės uždegimą, pigmentinis retinitas yra ne uždegiminis susirgimas, o distrofija ar genetiškai nulemta degeneracija. Bet kokios kilmės pigmentinis retinitas lemia fotoreceptorių ląstelių apoptozę – iš pradžių lazdelių, terminalinėse stadijose ir kūgelių.(12)

Kol kas manoma, kad pagrindinis ligą nulemiantys veiksnys yra genetinė predispozicija. PR gali pasireikšti kaip izoliuotas sporadinis sutrikimas arba paveldėtas autosominiu dominantiniu (~ 10-20 % atvejų), autosominiu recesyviniu (~ 20 % atvejų) būdais arba susijęs su X chromosoma (~ 10 % atvejų). Dauguma atvejų yra rodopsino geno mutacijos. (11,12)

Ši liga turi įvairių klinikinių išraiškų ir simptomų pradžia priklauso nuo ligos genetinio tipo – autosominė recesyvinė forma dažniausiai pasireišk ankstyvoje paauglystėje, o autosominė

dominantė forma gali pasireikšti tik antrojo dešimtmečio pabaigoje. Daugiau nei 75 proc. pacientų turės nustatytą diagnozę ir aktyvius simptomus iki 30 metų.(11)

Kadangi dažniausiai pigmentinis retinitas pažeidžia iš pradžių lazdeles, o vėliau ir kūgeliu – pirmieji simptomai dažniausiai yra blogas matymas tamsoje (niktalopija), vėliau seka periferinio regos lauko praradimas ir po kelių dešimtmečių visiškas aklumas. (13)

Neprogresuojantis naktinis aklumas

Neprogresuojantis naktinis aklumas (NNA) yra neprogresuojanti niktalopijos forma, įprastai pasireiškianti ankstyvame amžiuje, kurią gali lydėti sumažėjęs regos ryškumas, miopija, nistagmas ar žvairumas. (14,15) NNA būdingi įvairūs paveldėjimo būdai – autosominis dominantinis, autosominis recesyvinis ar susietas su X chromosoma. (16) Šiuo metu yra žinoma 11 genų mutacijų, kurios buvo nustatytos pacientams su NNA. Nustatytos mutacijos yra susijusios su kalcio kanalų funkcija (mutacijos *CACNA1F*, *CACNA2D4*, *TRPM1*) kalcio prijungimo funkcija *CABP4* mutacijoje, glutamato receptorių funkcija – *GRM6* ir išitraukimu į fototransdukcijos kaskadą *GNAT1*, *GRK1*, *PDE6B*, *SAG* ir *RHO* mutacijos.(14)

NNA yra skirstoma į NNA su normaliu dugnu ir pakitusiu dugnu. NNA su normaliu dugnu sukelia defektas lazdelių fotoreceptorių signalo perdavime. Dažniausiai paveldima su X chromosoma, nors būdingi ir autosominis recesyvinis ir dominantinis paveldėjimo būdai. Tarp visų paveldėjimo būdų yra heterogeniškumas. Nors pacientai dažnai skundžiasi niktalopija, akies dugnas išlieka normalus. Regėjimo aštrumas svyruoja tarp normalaus iki 0,1.

Su X chromosoma paveldimas NNA siejamas su mutacija *NYX* gene ir sukelia visišką NNA. Genas koduoja niktalopino baltymą, kuris atlieka svarbią rolę sinapsinėse jungtyse tarp fotoreceptorių ir bipolinėse ląstelėse. Yra nustatyta daugiau nei 50 šio geno mutacijų. *NYX* mutacija lemia apie 45 % atvejų, susijusių su X chromosoma paveldimu NNA.

Kita mutacija būdinga *CACNA1F* gene – ji sukelia nevisišką NNA. Nevisiško NNA metu pacientai turi pakankamai išlikusią lazdelių fotoreceptorių funkciją, kurią galima aptikti elektroretinogramos (ERG) tyrimu metu. Šis genas koduoja transmembraninį baltymą, kuris funkcionuoja kaip tinklainėi specifiška kalcio kanalo dalis, kuri yra atsakinga už glutamato atpalaidavimo reguliavimą bipolinėse ląstelėse. *CACNA1F* yra atsakingas už maždaug 55% su X chromosoma susijusių NNA.

Pacientai su pakitusiu dugnu (*fundus albipunctatus*) turi niktalopiją nuo gimimo, su daugybiniais baltais taškais matomais, išsidėsčiusiais akies dugne. Regėjimo aštrumas išlieka normalus, paveldimumas yra autosominis recesyvinis. Akies dugno autofluorescencijos metu matomas difuziškai sumažėjęs lipofuscino pigmento kiekis. OKT stebimi hiperreflektiniai pažeidimai periferinėje tinklainėje. ERG neaptinkamas lazdelių fotoreceptorių atsakas, tačiau kūgelių fotoreceptorių atsakas išlieka normalus. ERG atsakymai gali tapti normalūs po ilgesnės adaptacijos tamsoje per naktį. Mutacija aptinkama gene *RDH5*. Šis genas koduoja 11-cis-retinol dehidrogenazę, kuri konvertuoja 11-cis-retinol į 11-cis-retinal, tinklainės pigmentiniame epitelyje, todėl vizualinio pigmento regeneracija įvyksta vėliau.



2 paveikslas. Akies dugno nuotrauka esant NNA su pakitusiu akies dugnu (*fundus albipunctatus*). (17)

Oguči liga yra dažniausia Japonijoje, paveldimumas autosominis recesyvinis. Pacientai turi sutrikusį regėjimą nuo gimimo. Akies dugno tyrimo metu stebimas tipinis geltono tapeto blizgesys ar refleksas po trumpo šviesos poveikio (Mizuo-Nakamura fenomenas). Refleksas pradingsta po 2-3 valandų tamsos adaptacijos. Jei atliekamas skotopinis ERG po 20 minučių tamsos adaptacijos, lazdelių a-banga neaptinkama, tačiau jei atliekama po 1-2 valandų – pirmas spindulys sugeneruos a-bangą, kuri bus normali. Atsakas į antrą spindulį bus mažesnis. Oguči ligą lemia mutacija gene *SAG*, kuris koduoja arestiną, arba gene *GRK1*, koduojančiame rodopsino kinazę.(16)

Autosominiu dominantiniu būdu paveldimos NNA formos yra nulemiamos *GNAT1*, *PDE6B* ir *RHO* mutacijų – visos šios mutacijos yra susijusios su fototransdukcijos kaskada.(18–20)

GNAT1 koduoja guanino nukleotidą surišantį baltymą α , α - perkeliantį polipeptidą 1, kuris prijungia α subvienaę prie lazdelės impulsa perduodančio baltymo, kuris stimuliuoja rodopsino ir GMP fotoreceptorių vizualinio atsako metu. *PDE6B* koduoja fosfodiesterazės 6B (membraninio fermento) β subvienaę, kuris yra atsakingas už lazdelės fotoreceptoriaus hiperpoliarizaciją. Mutacijos *RHO* gene yra labiau stebimos pacientuose su pigmentiniu retinitu, paveldėtu autosominiu dominantiniu būdu, tačiau pasitaiko ir NNA – tai priklauso nuo paveiktų aminorūgščių.(21) Viena studija aptiko *RHO c.884C>T:p.Ala295Val* mutaciją šeimoje su autosominiu dominantiniu NNA, kur pacientai turėjo sumažėjusį jautrumą ir atsaką į mažesnio intensyvumo šviesą be papildomos tinklainės degeneracijos.(22)

Kūgelių ir kūgelių-lazdelių distrofija:

Kūgelių (KD) ir kūgelių-lazdelių (KLD) distrofijos pasireiškia žymiai smarkesniu poveikiu regos aštrumui nei, pavyzdžiui, lazdelių ar lazdelių-kūgelių distrofijos, kadangi pažeidžiami receptoriai atsako už didelį regos aštrumą bei spalvų suvokimą. Nistagmas ir fotofobija taip pat gali pasireikšti, tačiau vėlesnėse stadijose, kurių metu degeneruoja ir lazdelių fotoreceptoriai. Kaip ir lazdelių dominuojančiuose distrofijose, kūgelių ir kūgelių-lazdelių distrofijos gali būti progresuojančios ir statiškos.(14)

Pirmieji simptomai KD ir KLD pasireiškia ankstyvoje vaikystėje arba paauglystėje. Turintiems sutrikimą pasireiškia tik kūgelių (KD) arba kūgelių, o vėliau ir lazdelių, degeneracija (KLD). Šias dvi distrofijas skiria lazdelių įtraukimas į degeneracijos procesą, kuris sukelia stipresnius simptomus, lemiančius, kad daugelis pacientų apanka iki 40 metų.(23) Atliekant akies dugno ištyrimą, geltonosios dėmės išvaizda gali būti skirtinga, kai kuriais atvejais atrodyti atrofiška arba matomi tinklainės pigmentiniai depozitai. Šiuo metu yra virš 30 aprašytų genų su aptiktomis mutacijomis, sukeliančiomis ligą, kurios atlieka įvairias roles ir yra iš panašių funkcinių grupių kaip ir lazdelių distrofijose, bet su funkcijos specifiškumu kūgelių fotoreceptoriams. Nuo 20 % autosominiu dominantiniu būdu paveldimos ir nuo 74% su X chromosoma susietos KD ar KLD gali būti nustatomos molekulinės priežastys. Tuo tarpu autosominiu recesyviniu būdu paveldimos KD/KLD kilmė buvo nustatyta 23-25% atvejų.(24) Taigi, nemažai šios ligos atvejų sukiantys genai dar nėra žinomi, ypač autosominių dominantinių ir recesyvinių formų.

Kai kurios genų subgrupės, kur mutacijos sukelia KD ar KLD yra taip pat asocijuojamos su kitomis tinklainės distrofijų formomis, tikėtina, dėl atliekamos funkcijos visoje tinklainėje ir

fotoreceptoriuose. Pavyzdžiui, *ABCA4* geno mutacijos yra labiau siejamos su PR ir juvenilinės makulos degeneracijos forma (Stargardt'o liga)(25,26), tačiau šio geno mutacijos yra ir dažniausiai aptinkamas mutacijos sergantiems autosominiu būdu paveldėtoms KD ir KLD – atitinkamai 9 % ir 26 % atvejų.(23) Taip pat sutrumpintos *ABCA4* mutacijos yra dažnesnės KLD pacientų grupėse nei KD – atitinkamai 76% ir 63%.(23,24)

Achromatopsija

Egzistuoja dvi formos kūgelių fotoreceptorių pastovios distrofijos – visiška arba nevisiška achromatopsija, kurios atitinkamai nulemia visų spalvų arba tam tikros spalvos suvokimą. Tritanopija - sutrikęs mėlynos spalvos matymas yra autosominio dominantinio fenotipo, kuri nulemia mutacijos gene *OPN1SW*, kuris koduoja trumposioms bangoms jautrų opsiną, aptinkantį mėlyną šviesą.(27) Šiuo metu žinomi su autosomine recesyvine visiška achromatopsija siejami genai yra *CNGA3*, *CNGB3*, *GNAT2*, *PDE6C* ir *PDE6H*. *CNGB3* mutacija sukelia iki 50 % šių atvejų. (28) *CNGA3* ir *CNGB3* koduoja kūgelių fotoreceptoriuose esančių cGMP vartų kanalų α ir β subvienetus, kurie atlieka kertinę funkciją fototransdukcijoje. (28,29) *GNAT2* koduoja kūgeliams specifinį transduciną – kūgelių vaizdinio pigmento, skatinančio vienus pirmųjų fototransdukcijos kaskados žingsnių, α subvienetą. (30) *PDE6C* ir *PDE6H* koduoja specifinius kūgelių cGMP fosfodiesterazės α ir γ subvienetus. Šis fermentas yra atsakingas už cGMP pavertimą į 5'-GMP esant šviesos poveikiui.(31,32)

Genetinis persiklojimas tarp nesindrominių tinklainės distrofijų (PR, kūgelių distrofijų) ir pastovių formų yra visai kompleksiškas (3 paveikslas). Genetinis persiklojimas yra tikėtinas dėl fundamentalių panašumų fotoreceptorių struktūroje ir ląsteliniuose procesuose, nepaisant, ar receptoriai skotopinės, ar fotopinės funkcijos.(14)

Lėberio paveldima amaurozė (LPA)

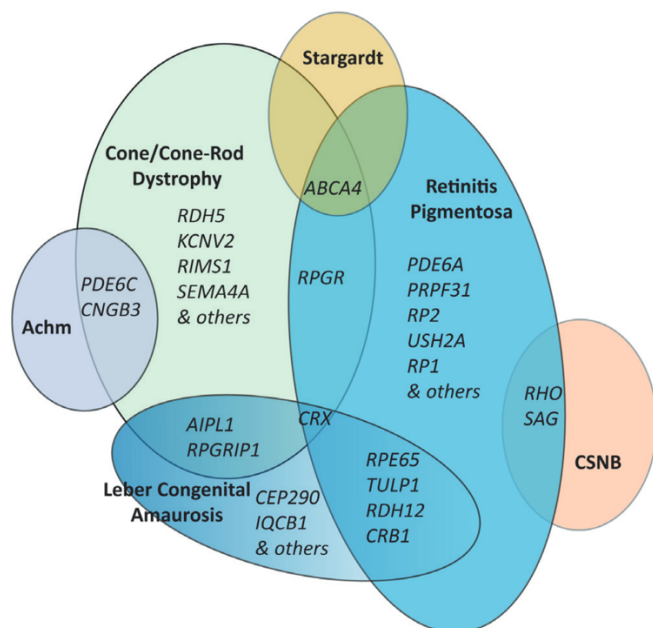
Lėberio paveldima amaurozė yra pati dažniausia nesindrominė generalizuota tinklainės distrofija. LPA pirmieji simptomai pasireiškia per pirmuosius gyvenimo metus. Būdingi klinikiniai požymiai: prastas regėjimas, nistagmas ir nenustatomas atsakas į šviesą ERG tyrimo metu.(33) LPA būdingas Franschetti okulodigitalinis simptomas, kuomet pacientas pakartotinai trina savo akis. Tinklainės išvaizda skiriasi pradinėse ligos stadijose ir buvo pastebėti tinklainės pigmentiniai pokyčiai progresuojant ligai.(33) Taip pat buvo pastebėta ir manoma, kad egzistuoja genetiniai-fenotipiniai tinklainės išvaizdos bruožai – permatomas

tinklainės pigmentinis epitelis su baltais taškeliais esant *RPE65* geno mutacijoms ir progresuojančia makulos atrofija - prie *NMNAT1*, kuri taip pat buvo pastebėta pacientuose su *AIP1* ir *CRB1* mutacijomis.(34) Šiandieną yra virš 20 genų, siejamų su LPA, iš kurių beveik visi atitinka autosominį recesyvinį paveldėjimo būdą. Nepaisant to, tikslios genetinės LPA priežastys kol kas yra neišaiškintos(35), stebimas ženklaus genetinis persiklojimas su kitomis tinklainės distrofijų formomis.(3 paveikslas)

Choroideremija

Vienintelė su X chromosoma susijusi nesindrominė generalizuota tinklainės distrofija yra choroideremija, kurią nulemia mutacija gene *CHM*.(36) Pacientams antrame gyvenimo dešimtmetyje atsiranda niktalopija ir progresuojanti fotoreceptorių, tinklainės pigmentinio epitelio ir gyslainės degeneracija. Paveiktiems vyrams matoma chorioretininė šukuota atrofija (chorioretinal scalloped atrophy) dugno vidurio periferijoje. *CHM* koduoja REP-1 rab 1 baltymo, atsakingo už intraląstelinį baltymų ir organelių transportą, subvienetą.(37) Įvairios mutacijos, insercijos ir delecijos buvo siejamos su šia liga. Įvairios studijos, naudojantios genominius įrankius, suteikiančius molekulinę diagnozę, yra vis naudingesnės klinikinei diagnozei nustatyti.(14)

Stebint klinikinius bruožus ir genetines priežastis nesindrominiuose degeneraciniuose ir neprogresuojančiose tinklainės distrofijose, įskaitant PR, KD/KLD, LPA, NNA ir achromatopsiją – radiniai indikuoja, kad yra didelis klinikinis ir genetinis persipynimas šiose ligose. (3 paveikslas) Šių sutampančių klinikinių bruožų ir genetinių priežasčių žinojimas ir išmanymas yra labai svarbus kuriant naujus molekulinis ištyrimo metodus, genetikos rezultatų vertinimo algoritmus bei gydymą šioms ligoms.



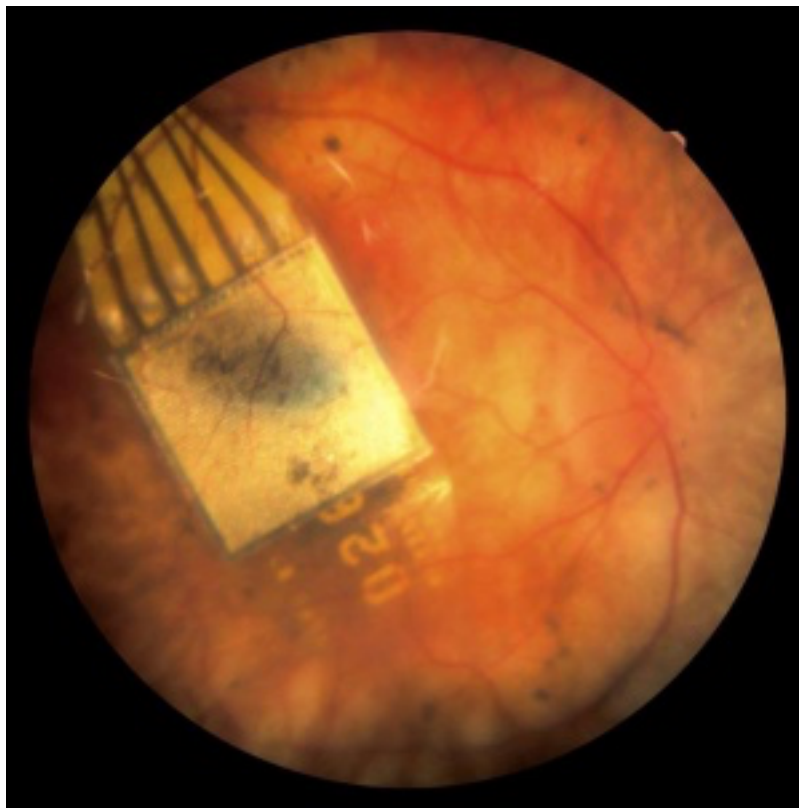
3 paveikslas. Paveldimų tinklainės distrofijų genų heterogeniškumas.(14)

Diagrama demonstruoja persipynimą tarp genetinių priežasčių ir skirtingų paveldimų tinklainės distrofijų formų.

GYDYMO METODAI:

Tinklainės distrofijas turintys pacientai susiduria su nemažai iššūkių ir sunkumų gyvenime, pavyzdžiui: apsunkintas kasdinių užduočių atlikimas, emociniai ir psichologiniai iššūkiai, problematiška dalyvauti socialinėje veikloje, susirūpinimas dėl savo saugumo ir sveikatos, gausybė regos simptomų, sutrikęs mobilumas ir orientacija, darbo pasirinkimo ir finansiniai sunkumai ir kt. (38) Iki atliktos pažangos genų terapijos moksluose, tinklainės distrofijų pacientai buvo gydomi reguliariai tikrinant jų būklę ir sekant ligos progresavimą, suteikiamos genetinės ir prenatalinės konsultacijos, jei reikalinga, pagalba prastai regintiesiems ir, esant galimybėms, įtraukimas į klinikinius tyrimus. Pacientams, kurie yra akli dėl išorinės tinklainės degeneracijos, bet dar išsaugojo vidinę tinklainės struktūrą ir optinį nervą, yra išrasti tinklainės protezai (dar vadinami „bioninėmis akimis“) – epiretininiai ir subretininiai, kurie gali pakoreguoti regą tiek, kad padėtų pagerinti paciento mobilumą ar atlikti specifines kasdienes užduotis. Tad, daugeliu atvejų kol kas galime gydyti ligos sukeltas komplikacijas, pavyzdžiui, cistinę makulos edemą (CME) ar komplikuotą kataraktą.(39) Todėl taip pat svarbu sekti prevenciškai ir šių komplikacijų išsivystymą ar koreguoti jų padarinius joms esant. Nors vietinio veikimo ir oraliniai karboanhidrazės inhibitoriai parodė morfologinius pagerėjimus – sėkmingai sumažėjusią cistinę makulos edemą, efektas regos aštrumui buvo

prieštaringas skirtinguose tyrimuose ir išlieka negalutinis.(40) Vienas tyrimas atskleidė, kad CME išoriniame branduoliniame sluoksnyje parodė geresnę atsaką į gydymą su vietiniais ir oraliniais karboanhidrazės inhibitoriais nei CME vidiniame branduoliniame sluoksnyje, kur CME esant tinklainės distrofijoms randama dažniausiai.(41) Intravitrealiniai deksametazono implantai (Ozurdex) parodė regos aštrumo pagerėjimą ir edemos rezoliuciją, tuo tarpu intravitrealinis triamcinolono acetonidas parodė anatominių pagerėjimą be regos aštrumo pagerėjimo. Taikant gydymą gliukokortikosteroidais, kataraktos ir akispūdžio padidėjimo vystymasis turi būti atidžiai sekamas šiuose TD pacientuose, kurie turi padidintą riziką abiejų išsivystymui. Intravitrealinės injekcijos kraujagyslinio endotelio augimo faktoriaus inhibitoriaus (KEAFI) parodė taip pat nepastovius rezultatus CME gydyme. Jokio regos aštrumo pagerėjimo gydant CME komplikaciją KEAFI preparatais nepavyko pasiekti.(42–44)



4 paveikslas. Akies dugno nuotrauka su tinklainės implantu Alpha-IMS. (45)

Įvairių tinklainės distrofijų ligų tyrimai ir atskleisti nauji ligas sukeliantys genai bei patogenetiniai mechanizmai paklojo pamatus genų terapijos gydymo metodams vystyti.(4) Genų terapijos pagrindinis veikimo principas yra paremtas defektuotos deoksiribonukleininės rūgšties (DNR) modifikacija recipiento ląstelėse, kad būtų pasiektas norimas terapinis efektas. Lyginant su kitais organais, akys turi didesnę potencialą genų terapijai dėl savo lengvo prieinamumo - nesudėtingai pasiekiamų injekcijų, chirurginių intervencijų vietų,

struktūros, atliekančios gerą barjerinę funkciją izoliuojant nuo kitų organų, taip pat dėl jau egzistuojančių neinvazinių tinklainės struktūros ir anatomijos vertinimo metodų, kurie leistų nustatyti atsaką į gydymą. Taip pat tinklainės distrofijos dažniausiai būna bilateralios, kas leidžia klinikiniuose tyrimuose iškart turėti kontrolinę akį. Nepaisant visų privalumų, pažengusios tinklainės distrofijų formos yra negrįžtamos ir geri gydymo rezultatai priklauso nuo esamų gyvų neuronų ląstelių kiekio pradedant genų terapiją.(46)

Genų terapija sudaryta iš ligą sukeliančio geno klonuotos kopijos, promoterio, kuris specifiskai reguliuoja genų ekspresiją ląstelėse taikiniuose ir vektoriaus (nešiklio), kuris, dažniausiai, yra nukleokapsidinis virusas, kuris atlieka „kurjerio“ funkciją ir pristato reikalingą geną iki ląstelės taikinio šeiminiuke. (46) Gydymo genų terapija sėkmė priklauso nuo vektoriaus pasirinkimo, todėl transgeno ekspresija turi trukti kaip įmanoma ilgiau ir turėti kuo mažesnę imunogeniškumą, kadangi šeiminiuko imuninis atsakas nulemia transgeno ekspresijos trumpumą. Dažniausiai pasirenkami vektoriai, kurie yra neintegruojami į šeiminiuko genomą, kadangi integracija gali sukelti nepageidaujamų reiškinių. Kiti pageidaujami genų pernešančio vektoriaus bruožai yra: ląstelinis specifiskumas, kai paveikiamos tik ląstelės taikiniai, didelė ar neribota klonų talpa, toksiškumo nebuvimas ir lengva didelių vektoriaus titrų gamyba išliekant dideliame grynumei. (4) Šiuo metu tiriamos ir egzistuoja kelių tipų genų pristatymo, pakeitimo sistemos: virusiniai vektoriai (adenovirusų, lentivirusų, adeno-asocijuotų virusų); nevirusinis genų pernešimas ir genų redagavimas.

ADENO-ASOCIJUOTI VIRUSAI (AAV)

Virusiniai vektoriai - iš jų sėkmingiausi ir daugiausiai žadantys šiuo metu yra adeno-asocijuoti virusai (AAV), kadangi juose, nėra jokių viruso kodo grandinių tarp vektorių, kas leidžia išvengti imuninio atsako atpažinimo ir atmetimo, taip pat AAV gali užkrėsti tiek besidalijančias, tiek nesidalijančias ląsteles. Tačiau AAV dar apriboja jų maža kodo talpa, kadangi jų negalima panaudoti mutacijoms genuose, kurių kodo seka viršija 5kb. Dėl to pradėta dėti daug pastangų, kad būtų sukurtos naujos strategijos, kurios leistų padidinti AAV vektorių talpą.(47) AAV yra vieni mažiausių virusų, kurių iki šios dienos yra atrasta virš 100 serotipų skirtingose gyvūnų rūšyse. Serotipai tarpusavyje skiriasi kapsidės baltymo seka. Rekombinuoti AAV vektoriai, naudojami genų terapijoje, dažniausiai remiasi AAV2 serotipu – tai buvo pirmasis apibūdintas žmogaus serotipas ir tuo pačiu geriausias. Kadangi AAV kapsidės baltymas yra atsakingas už tropizmą (nukreipimą) ir tuo pačiu efektyvumą, buvo išrasta pseudotipavimo strategija, kur pseudotipuoti arba hibridiniai AAV replikacijos vektoriai užkoduoti (dažniausiai) su serotipu AAV2, o kapsidės kitu serotipu. Taip pasitelkus

ląstelės taikymosi strategijas galima ne tik tiksliau išrinkti ląsteles, su kuriomis vektorius kontaktuos, bet ir pagerinti genų pernešimo efektyvumą, kadangi prasibrovimas pro ląstelės barjerą ir viduląstelinis judėjimas tiesiogiai ir netiesiogiai priklauso nuo kapsidės struktūros. Neseniai greta pseudotipavimo yra kuriamos kitos strategijos specialioms kapsidėms kurti, pavyzdžiui, mozaikinės kapsidės (sudarytos iš skirtingų serotipų subvienetų) ar chimerinės kapsidės (sudėtyje turinčios kapsidės baltymų, kurie modifikuojami amino rūgštimis iš skirtingų serotipų). Taigi, paskutiniu metu toks bibliotekinis parinkimas ir tikslinis modifikavimas labai daug žada AAV vektorių tropizmo gerinime. Akių genų terapijos kontekste pseudotipavimas išlieka pagrindine strategija vektorių adresavime ir specifinių ląstelių tipų pasiekime. Pseudotipuoti vektoriai buvo naudojami gydant skirtingus gyvūnų modelius su skirtingais tinklainės sutrikimais – nuo LPA ir PR iki autoimuninio uveito ir neovaskulinių sutrikimų. Jie taip pat buvo panaudoti ir klinikiniuose tyrimuose gydant LPA. (4,48)

ADENOVIRUSAI

Adenovirusai yra dažniausiai naudojama vektorių grupė genų terapijoje dėl savo talpos ir sėkmingo genų pristatymo į daug ląstelių tipų. Tačiau fotoreceptorių transdukcija per adenovirusinius vektorius yra prasta. Lyginant su kitais vektoriais adenovirusai gali nešti didelius intarpus (iki 48kb), bet jiems trūksta saugumo ir ilgesnio ekspresijos laiko dėl ekspresuojamų viruso genų transdukuojamose ląstelėse. Tai sužadina imuninę atsaką prieš transdukuojamas ląsteles, kas lemia trumpą ekspresiją ir ilgai trunkantį toksiškumą. Todėl adenovirusai yra nelabai tinkami patologijoms, kuriose reikalinga ilgai trunkanti transgeninė ekspresija.(4) Kad adenovirusų vektoriai taptų saugesni ir efektyvesni kai kurie mokslininkai pabandė įtraukti mažiau viruso genų į rekombinuotą virioną – ištrindami tam tikrus regionus, atsakingus už replikaciją ar už transkripcinę viruso genų ekspresijos ir genomo replikacijos kontrolę. (49,50) Vėliau buvo pabandyta pagerinti adenoviruso vektoriaus saugumą ir efektyvumą vystant nuo pagalbininko priklausomą adenoviruso vektorių, pašalinant jame visas virusines sekas išskyrus terminalines ir pakavimo sekas. Taip buvo išsaugotos ankstesnės adenovirusinio vektoriaus savybės – didelis efektyvumas ir transgenų ekspresija – ir tuo pačiu pasiektas ilgas transgeno ekspresijos laikas ir toksiškumo nebuvimas. Deja, bet vis dar išlieka problemos taikant šias technikas, kaip - pagalbininko viruso užkrėtimas, vektoriaus nestabilumas ir daugintis galinčio adenoviruso pavojus.(4)

LENTIVIRUSAI

Lentivirusai yra RNR virusai, priklausantys retrovirusų šeimai, kurie turi atvirkštinę transkriptazę, kurios pagalba gali integruoti retrotranskribuotą provirusinę DNR į šeimininko ląstelės chromosomas. PTD gydymui buvo tirti retrovirusinis ŽIV-1 viruso variantas arba arklių infekcinės anemijos virusas (EIAV). Lentivirusai turi savybę prasiskverbti pro nepažeistas branduolio membranas ir užkrėsti besidalijančias ląsteles,(51) tuo tarpu retrovirusai gali užkrėsti tik besidalijančias ląsteles tuo metu, kai branduolio membrana ištirpsta ląstelės dalijimosi metu, kas lemia jų netinkamumą naudoti postmitotiniams audiniams kaip tinklainė. Lentivirusai gerai integruojasi į šeimininko ląstelės genomą ir gali vykdyti stabilią ekspresiją. Tačiau tai didina insercijos mutagenozės riziką ir paskatino vystyti neintegruojamus vektorius, kurie turi panašias transdukcijos savybes ir išlieka kaip episominė dvigrandė DNR, galinčios transdukuoti nesidauginančias ląsteles. Tokie vektoriai yra pateikiami su integracijos trūkumu, atlikus taškinę mutaciją integracijos gene. Buvo pademonstruota efektyvi ir nepertraukiama transgeninė ekspresija in vivo naudojant neintegruojamus lentivirusų vektorius postmitotiniuose audiniuose, kaip pigmentinis tinklainės epitelis, kuri buvo lygiavertė integruojamųjų vektorių poveikiui. Lentivirusai yra modifikuojami taip, kad būtų sustabdyta jų replikacija, todėl šie virusai yra nepatogeniški po genų pristatymo – taip siekiama juos padaryti papildomai saugesnius klinikiniam taikymui. Šiuo metu lentivirusų talpa transgeniui yra apie 8-10kb ir yra įgalūs užkrėsti pigmentinio tinklainės epitelio ląsteles ir siauresniu mastu diferencijuotus fotoreceptorius. EIAV buvo naudoti *ABCA4* mutacijoms koreguoti, kadangi komplementarios DNR dydis yra 6.8 kb ir viršija AAV vektorių talpos galimybes, bet yra tinkamas lentivirusams,(52) tačiau po ilgų metų bandymų tyrimas ([NCT01367444](#)) buvo nutrauktas be aiškių efektyvumo rezultatų. Taigi, lentivirusų vektoriai kol kas yra apriboti pigmentinio tinklainės epitelio genetinė korekcija, kadangi tai kol kas yra vienintelis ląstelių tipas, kuriame buvo pasiektas pakankamai didelis efektyvumas terapiniams tikslams pasiekti. Taip pat lentivirusų vektoriai gali būti naudingi terapiniuose tiksluose - esant fotoreceptorių defektams – tarpininkaujant sekretuojamų faktorių pristatyme, pavyzdžiui, neurotrofinių ar antiapoptotinių faktorių, į tinklainės pigmentinį epitelį. (4)

NEVIRUSINIS GENŲ PERNEŠIMAS

Nevirusinis genų pernešimas remiasi nanodalelėmis, nuogomis DNR ar liposomomis, kurias yra žymiai pigiau ir lengviau pagaminti dideliais kiekiais nei virusinius vektorius.(4) Neseniai pasirodžiusiame tyrime (53)Da Sun ir kt. pristatė nevirusinę genų pernešimo platformą, sudarytą iš susijungiančių multifunkcinių lipidų nanodalelių, užpildytų norima

plazmidine DNR, skirtą paveldimų tinklainės ligų gydymui. Autoriai pademonstravo, kad pakartotinos plazmidinės DNR, su norimais genais, modifikuotais taip, kad būtų pagerinta genų ekspresija, subretininės injekcijos yra saugios ir efektyvios ilgalaikiai genų ekspresijai *STGDI* pelėse. Nevirusinis genų pernešimo metodas taip pat demonstruoja pranašumą prieš virusinius vektorius transfekcijos veiksmingume, imunogeniškume ir vektoriaus genetinėje talpoje. Tačiau, išlieka trūkumai, kuriuos reikėtų turėti omenyje ir tobulinti prieš taikant tokį gydymą žmonėms, kaip - tinklainės atšoka, imuninės reakcijos, komplikacijos dėl antikūnų susiformuojančių *in vivo* prieš polietilenglikolį, kuris naudojamas genų pernešime, kad sumažintų nespecifinių genų pernešimo riziką. Nepaisant šių trūkumų, studijos rodo, kad nevirusinis genų pernešimas turi didelį potencialą genų terapijoje ateityje.(54)

GENŲ TILDYMAS

Esant genetinėms ligoms, kurios yra autosominio dominantinio paveldėjimo, kaip, pavyzdžiui, viena dažnesnių PR formų (adPR), apie 30-40 % atvejų yra nulemti funkcijos įgyjimo mutacijų *RHO* gene, kuris koduoja rodopsiną. Tokiais atvejais, dėl mutacijų yra gaminami pakitę baltymai, kurie toksiškai veikia ląsteles. Terapinės strategijos tikslas yra sutaisyti arba nutildyti mutavusį geną. Šiuo metu yra siūlomos dvi strategijos tokioms būklėms gydyti tildant mRNR. Pirmoji strategija – panaudoti specialius alelių inhibitorius, kurie skatina mutavusios mRNR suirimą ir taip ekspresuojamas kitas normalus alelis, ko pakanka normaliam fotoreceptorių ląstelių funkcionavimui. Antroji – nepriklausoma nuo mutacijų – kai abu aleliai yra supresuojami ir pakeičiami neužtildyta normalia geno forma. Abi strategijos gali būti išpildomos antisensiniais inhibitoriais kaip ribozimai, antisensiniai oligonukleotidai ar maži RNR inhibitoriai (siRNA). (4)

RIBOZIMAI

Ribozimai yra visos RNR molekulės, kurios pasižymi katalitiniu aktyvumu. Šiuo metu dažniausiai naudojami yra plaktuko ir plaukų segtuko ribozimai, kurie specifiskai inhibuoja genų ekspresiją ir yra patogūs dėl savo mažo dydžio ir gero specifiskumo. Kol kas buvo atliekami tyrimai Drenserio ir kt. su *RHO p.P23H* ir *p.S334Ter* mutacijomis, pademonstravo ribozimų efektyvumą, priklausantį nuo mutacijų, *P23H* pelės modelyje.(55,56) Taip pat nuo mutacijų nepriklausomi bandymai parodė, kad ribozimai gali skelti rodopsino mRNR *in vitro*.(57–59)

Ribozimų atpažinimo seka yra gerai išreikšta genome, kas sukelia didesnę efekto riziką netaikiniuose. Nuo mutacijų, alelių nepriklausomi RNR inhibitoriai yra patogesni, kadangi gali būti naudojami prieš skirtingas mutacijas tame pačiame gene. Optimaliajai terapijai, tokia strategija turėtų būti derinama su geno, koduojančio normalų baltymą, pristatymu.(60) Kad

tai būtų įmanoma, reikia abi molekules transportuoti tame pačiame AAV vektoriuje. Tačiau, kol kas abi sekos yra per didelės ir netelpa į AAV vektorius, todėl pristatymas bus svarbus aspektas kuriant šią strategiją.

MAŽI RNR INHIBITORIAI

Maži RNR inhibitoriai yra fundamentalus būdas, kuriame maža RNR su specifine grandine geba nusitaikyti ir atskirti komplementarią mRNR. Procesas yra išprovokuojamas ilgų dalių dvigubų RNR (dsRNR), kurios yra skeliamos į mažus fragmentus, žinomus kaip siRNR su RNazės III fermentu. SiRNR gali būti sintetiškai gaminama ir pristatoma į ląstelę. SiRNR pristatymas į užpakalinį akies segmentą kol kas yra sudėtinga užduotis, kadangi siRNR turi praeiti stiklakūnį, kad pasiektų tinklainę. Kadangi sintetinė siRNR gali būti suskaidyta endonukleazių, reikalingos daugkartinės injekcijos, kas sukelia šalutinių poveikių riziką, kaip katarakta, tinklainės atšoka, stiklakūnio hemoragijos ir endoftalmitas. Rodopsino mRNR tildymas su siRNR, esant adPR, turi panašias strategijas kaip ir su ribozimais – pirmoji taikosi į alelio tildymą ir jo transkripcijos blokavimą yra priklausoma nuo specifinės mutacijos, antroji blokuoja abiejų alelių inhibicija ir geno alternatyvos (rodopsino) pateikimas. Pasirinkus pirmąją strategiją buvo nepakankama tinklainės degeneracijos inhibicija buvo nepakankama transgeniniuose pelių modeliuose. Taip pat taikant šią strategiją būtų reikalinga atskira specifinė terapija kiekvienai mutacijai, kas pareikalautų didelių finansinių ir laiko išteklių.(4) Todėl pasirenkant antrąją strategiją O'Reilly su kolegomis pademonstravo pakankamą rodopsino RNR inhibiciją ir pakaitinių genų ekspresiją pelėse po subretininių injekcijų su AAV vektoriumi – ekspresuojančiu tiek siRNR, tiek pakaitinį rodopsino geną.(60) Panašiai tokia intravitrealinė injekcija su AAV sukėlė 10 dienų naudingą efektą išoriniame branduoliniame pelės tinklainės sluoksnyje, simuliuojant žmogaus tinklainės PR susietą su *P23H* rodopsino mutacija. Taip pat neseniai ir ilgalaikis tinklainės struktūros ir funkcijos atkūrimas buvo pasiektas *P23H* rodopsino transgeninėse PR pelėse su nuo mutacijų nepriklausomu rodopsino siRNR ir rodopsino RNR pakaitalu.(61) Kiti genai, siejami su adPR, kaip *RDS* ar *RHO*, taip pat yra siRNR paremta supresija ir genų pakaitalų technologijos vystytojų akiratyje. (62,63) Šios studijos demonstruoja ir daug žada, kadangi RNR inhibicija su tinkamu geno pakaitalo pateikimu gali išsaugoti fotoreceptorius, kaip tai ir pavyko pademonstruoti gyvūnų modeliuose.

ANTISENSINIAI OLIGONUKLEOTIDAI

Kita alternatyva koreguoti pakitusiems splaisingo mechanizmams yra paremta naudojant antisensinius oligonukleotidus (AON), kurie yra sudaryti iš DNR ar RNR molekulių, kurios gali būti paleistos kaip laisvi oligonukleotidai arba ekspresuojami virusinio vektoriaus. AON puikiai užkerta kelią pakitusiems splaisingo mechanizmams ir atstato normalų jungimąsi. Lyginant su genų terapija, kurioje pateikiami normalūs genai, AON paremta terapija turi daug privalumų, ypač turint omenyje akies imuninius privalumus,(3) ir tai leidžia AON molekules pristatyti tiesiogiai į tinklainę intravitrealinių ir subretininių injekcijų pagalba su minimaliais toksiškais imunologiniais šalutiniais poveikiais. (64) Neseniai pora tyrimų atskleidė, kad suleisti laisvi AON, siekiant išsaugoti *CEP290* egzonus, pelių tinklainėse nulėmė tikslinio egzono praleidimą. Taip pat šie tyrimai parodė, kad molekulės pasiekė visus tinklainės sluoksnius be šalutinių poveikių. (65) Kitas tyrimas pademonstravo AON panaudojimą *RHO* mutavusio alelio sėkmingam suirimui įvykdyti autosominiam dominantiniui pigmentiniam retinitui gydyti pelėse. (66) Laisvi AON turi pranašumą dėl savo mažo dydžio gerai ir tiksliai prasiskverbti iki tinklainės, tačiau turi trūkumą, kad greitai suyra, kas lemtų dažnas pakartotinas injekcijas. Tuo tarpu su AAV transportuojami AON galėtų lemti ilgalaikį teigiamą poveikį kelerius metus, galimai, net visą gyvenimą. Garanto ir kt. pademonstravo, kad AON, pernešti su AAV į tinklainę *CEP290* geno mutacijų sukeltai LPA gydyti, lėmė sutvarkytą *CEP290* jungtį, *CEP290* baltymo lygiai buvo atstatyti ir krumplyno fenotipas buvo išsaugotas. Pelėse su humanizuotomis tinklainėmis, kurios turėjo *CEP290* mutaciją, tiek laisvos AON, tiek su AAV transportuotos AON pademonstravo teigiamus rezultatus su *CEP290* siejamai LPA gydyti. Taigi, AON grįsta terapija galėtų būti efektyvus būdas stabdyti tam tikrą PTD vystymąsi arba net pagerinti regėjimo funkciją daugeliui individų su regos sutrikimais. (67)

GENŲ REDAGAVIMAS SU CRISPR-Cas9

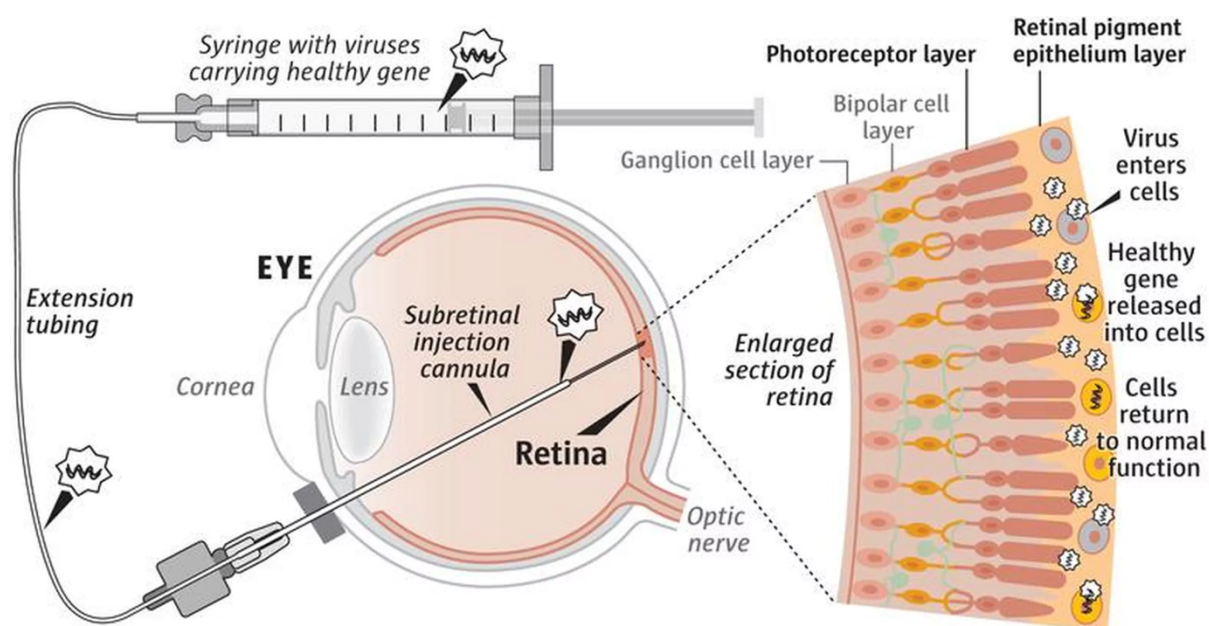
Dar viena perspektyvi genų terapijos šaka yra genų redagavimas ir jo įrankiai, kaip CRISPR-Cas9 sistema. Šia sistema paremtu gydymu yra atliekami bandymai daugelyje gyvūnų modelių su PTD ir tikimasi, kad genų redagavimas taps vienu iš sprendimų genų terapijoje netolimoje ateityje. CRISPR-Cas9 sistemos veikimo modelis paremtas pakitusio splaisingo donoro pašalinimu ir taip atstatomu baltymo aktyvumu. Pagrindinis pavyzdys galėtų būti EDIT-101, kuris taikosi į nenormalų splaisingo donorą, sukeltą *IVS26* mutacijos *CEP290* gene, lemiantį LPA ir šiuo metu esantį pirmoje klinikinių tyrimų fazėje (NCT03872479). Suaugusiųjų dozavimo kohorta jau yra atlikta ir į tyrimą įtraukiami pirmieji pediatriniai pacientai. (iš ir.editasmedicine.com, Results and Business Updates, rugpjūčio 4, 2021) Taip

pat CRISPR-Cas9 sistema galėtų būti naudinga ligose, kurios negali būti suvaldytos paprastu tinkamo geno pridėjimu dėl toksiško mutavusio baltymo poveikio - CRISPR-Cas9 galėtų galėtų užtildyti endogeninį mutavusį geną ir pakeisti jį egzogeniniu norimu normaliu genu. Manoma, kad daug kitų PTD galėtų turėti ateityje gydymą, kadangi CRISPR-Cas9 „įrankių dėžė“ nuolat plečiasi. Nepaisant gerų rezultatų genų redagavimas turės gerai patobulėti, kol tokiais įrankiais bus galima gerinti pacientų gyvenimą – nemažai pastangų pareikalaus CRISPR-Cas9 efektyvumo padidinimas taikantis į tinklainę ir taikymosi rizikų sumažinimas, ypač skiriant dėmesį į kitus taikinius ir šalutinius produktus. Taip pat reikės optimizuoti vektorizaciją, siekiant tolimesnių klinikinių tyrimų, kadangi AAV turėjo šiek tiek trūkumų – imunogeniškumas ir padidėjusi rizika paveikti netaikinius dėl ilgai liekančių ekspresuojamų Cas9 derivatų. Manoma, kad išeitis galėtų būti nevirusiniai vektoriai, jei būtų išspręstas jų trūkumas – mažas veiksmingumas nerviniam audiniui. Taigi, genų redagavimo technologija, įrodžiusi geresnį veiksmingumą ir sumažinusi šalutinius poveikius, pretenduoja tapti tinkamu ir pažangiu sprendimu taikant genų terapijos gydymą už kelerių metų. (68)

LUXTURNA

Kol kas šiuo metu vienintelis patvirtintas Europos Vaistų agentūros (EMA), JAV Maisto ir Vaistų Administracijos (FDA) ir efektyvus genų terapijos preparatas tinklainės distrofijų gydyme yra Voretigenas neparvovekas (Luxturna), kuris leidžia gydyti tinklainės distrofijas, sukeltas mutacijų *RPE65* gene – tai būdingiausia Lėberio paveldimai amaurozei bei kai kuriems pigmentinio retinito atvejams. *RPE65* genas yra atsakingas už retinoidą izomerohidrolazę. Šis fermentas regeneruoja 11-*cis* retinalį, chromoforą, kuris atlieka kertinę rolę fototransdukcijoje fotoreceptorių ląstelėse. Esant mutacijoms *RPE65* gene šio baltymo arba trūksta, arba jis yra nefunkcionalus. Be šio baltymo, fotoreceptoruose sutrinka atsakas į šviesą ir jie degeneruoja. (69) Luxturna gali būti vartojamas tik tada, kai paciento tinklainėje yra išlikę pakankamai gyvybingų tinklainės ląstelių. Luxturna veikimo principas paremtas genų terapija naudojant adeno-asocijuotą virusą – tai reiškia, kad genas transportuojamas vektoriumi, kuris neintegruojamas į paciento genomą ir turi žemą imunogeniškumą. (70) Adenovirusas transportuoja įprastas, „sveiko“ *RPE65* geno kopijas į tinklainės ląsteles, dėl ko jos gali gaminti pilnai funkcionuojančia izomerohidrolazę – tai padeda tinklainės ląstelėms

geriau funkcionuoti, sulėtėja ligos progresavimas. (71)



5 paveikslas. Luxturna preparato injekcijos vizualizacija ir veikimo principas. (72)

IŠVADOS IR PASIŪLYMAI:

PTD yra didelė ir heterogeninė grupė neurodegeneratyvinių sutrikimų su dideliu neigiamu poveikiu pacientų regėjimui ir gyvenimo kokybei, savarankiškumui. Virš 250 mutacijų yra siejama su abipusių tinklainės distrofijų patogenezė. Terapinės galimybės yra nuolat intensyviai tyrinėjamos ir atrandamos naujos galimybės. Keleto klinikinių studijų, tarp jų ir įvairių genų terapijos technikų bandymų, rezultatai yra perspektyvūs ir žadantys galimybes ateityje grąžinti regėjimo funkciją be akių ar sisteminių šalutinių poveikių. Tyrimų efektyvumas ir saugumas atneša daug vilties, kad gydymas paveldimas tinklainės distrofijas turintiems pacientams bus sukurtas ir prieinamas. Kadangi paveldimų tinklainės distrofijų patogenezės ir keliai, vedantys į fotoreceptorių žūtį yra skirtingi – individualios ir įvairių mechanizmų derinių terapinės strategijos galėtų būti išėstis užtikrinant degeneracijos sustabdymą šiuose heterogeniškuose genetiniuose sutrikimuose.

LITERATŪROS SĄRAŠAS:

1. Sahel JA, Marazova K, Audo I. Clinical Characteristics and Current Therapies for Inherited Retinal Degenerations. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015 m. vasario;5(2):a017111.
2. Chiu W, Lin TY, Chang YC, Isahwan-Ahmad Mulyadi Lai H, Lin SC, Ma C, ir kt. An Update on Gene Therapy for Inherited Retinal Dystrophy: Experience in Leber Congenital Amaurosis Clinical Trials. Int J Mol Sci. 2021 m. balandžio 26 d.;22(9):4534.
3. Benhar I, London A, Schwartz M. The privileged immunity of immune privileged organs: the case of the eye. Front Immunol. 2012 m. rugsėjo 21 d.;3:296.

4. Ziccardi L, Cordeddu V, Gaddini L, Matteucci A, Parravano M, Malchiodi-Albedi F, ir kt. Gene Therapy in Retinal Dystrophies. *Int J Mol Sci*. 2019 m. lapkričio 14 d.;20(22):5722.
5. Cremers FPM, Boon CJF, Bujakowska K, Zeitz C. Special Issue Introduction: Inherited Retinal Disease: Novel Candidate Genes, Genotype–Phenotype Correlations, and Inheritance Models. *Genes (Basel)*. 2018 m. balandžio 14 d.;9(4):215.
6. Hereditary Fundus Dystrophies - ClinicalKey [Prieiga per internetą]. [žiūrėta 2023 m. vasario 8 d.]. Adresas: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780702077111000157?indexOverride=GLOBAL>
7. Chawla H, Vohra V. Retinal Dystrophies. *StatPearls* [Prieiga per internetą]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [žiūrėta 2023 m. vasario 8 d.]. Adresas: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564379/>
8. Hood DC, Ramachandran R, Holopigian K, Lazow M, Birch DG, Greenstein VC. Method for deriving visual field boundaries from OCT scans of patients with retinitis pigmentosa. *Biomed Opt Express*. 2011 m. balandžio 5 d.;2(5):1106–14.
9. Querques G, Carrillo P, Querques L, Bux AV, Del Curatolo MV, Delle Noci N. High-definition optical coherence tomographic visualization of photoreceptor layer and retinal flecks in fundus albipunctatus associated with cone dystrophy. *Arch Ophthalmol*. 2009 m. gegužės;127(5):703–6.
10. Thiadens AAHJ, Somervuo V, van den Born LI, Roosing S, van Schooneveld MJ, Kuijpers RWAM, ir kt. Progressive loss of cones in achromatopsia: an imaging study using spectral-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010 m. lapkričio;51(11):5952–7.
11. O’Neal TB, Luther EE. Retinitis Pigmentosa. *StatPearls* [Prieiga per internetą]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [žiūrėta 2023 m. kovo 2 d.]. Adresas: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519518/>
12. K. David Epley, M.D., Vinay A. Shah M.D., Koushik Tripathy, MD (AIIMS), FRCS (Glasgow), Dr John Davis Akkara (MBBS, MS, FAEH, FMRF), William Carrera, Jason Hsu, MD, Jennifer I Lim MD. Retinitis Pigmentosa - EyeWiki [Prieiga per internetą]. [žiūrėta 2023 m. kovo 2 d.]. Adresas: https://eyewiki.aao.org/Retinitis_Pigmentosa
13. Hamel C. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis*. 2006 m. spalio 11 d.;1:40.
14. Nash BM, Wright DC, Grigg JR, Bennetts B, Jamieson RV. Retinal dystrophies, genomic applications in diagnosis and prospects for therapy. *Transl Pediatr*. 2015 m. balandžio;4(2):139–63.
15. Boycott KM, Maybaum TA, Naylor MJ, Weleber RG, Robitaille J, Miyake Y, ir kt. A summary of 20 CACNA1F mutations identified in 36 families with incomplete X-linked congenital stationary night blindness, and characterization of splice variants. *Hum Genet*. 2001 m. vasario;108(2):91–7.
16. Tsang SH, Sharma T. Congenital Stationary Night Blindness. Tsang SH, Sharma T, sudarytojai. *Atlas of Inherited Retinal Diseases* [Prieiga per internetą]. Cham: Springer

- International Publishing; 2018 [žiūrēta 2023 m. kovo 6 d.]. p. 61–4. (Advances in Experimental Medicine and Biology; t. 1085). Adresas:
http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-95046-4_13
17. Fundus albipunctatus [Prieiga per internetą]. American Academy of Ophthalmology. 2013 [žiūrēta 2023 m. gegužės 16 d.]. Adresas:
<https://www.aao.org/education/image/fundus-albipunctatus-2>
 18. Gal A, Orth U, Baehr W, Schwinger E, Rosenberg T. Heterozygous missense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in autosomal dominant stationary night blindness. *Nat Genet.* 1994 m. gegužės;7(1):64–8.
 19. Dryja TP, Hahn LB, Reboul T, Arnaud B. Missense mutation in the gene encoding the alpha subunit of rod transducin in the Nougaret form of congenital stationary night blindness. *Nat Genet.* 1996 m. liepos;13(3):358–60.
 20. Yamamoto S, Sippel KC, Berson EL, Dryja TP. Defects in the rhodopsin kinase gene in the Oguchi form of stationary night blindness. *Nat Genet.* 1997 m. vasario;15(2):175–8.
 21. Sieving PA, Fowler ML, Bush RA, Machida S, Calvert PD, Green DG, ir kt. Constitutive „light“ adaptation in rods from G90D rhodopsin: a mechanism for human congenital nightblindness without rod cell loss. *J Neurosci.* 2001 m. rugpjūčio 1 d.;21(15):5449–60.
 22. Zeitz C, Gross AK, Leifert D, Kloeckener-Gruissem B, McAlear SD, Lemke J, ir kt. Identification and functional characterization of a novel rhodopsin mutation associated with autosomal dominant CSNB. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 m. rugsėjo;49(9):4105–14.
 23. Thiadens AAHJ, Phan TML, Zekveld-Vroon RC, Leroy BP, van den Born LI, Hoyng CB, ir kt. Clinical course, genetic etiology, and visual outcome in cone and cone-rod dystrophy. *Ophthalmology.* 2012 m. balandžio;119(4):819–26.
 24. Roosing S, Thiadens AAHJ, Hoyng CB, Klaver CCW, den Hollander AI, Cremers FPM. Causes and consequences of inherited cone disorders. *Prog Retin Eye Res.* 2014 m. rugsėjo;42:1–26.
 25. Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargardt disease gene ABCR - PubMed [Prieiga per internetą]. [žiūrēta 2023 m. kovo 20 d.]. Adresas:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9425888/>
 26. Zhou Y, Tao S, Chen H, Huang L, Zhu X, Li Y, ir kt. Exome sequencing analysis identifies compound heterozygous mutation in ABCA4 in a Chinese family with Stargardt disease. *PLoS One.* 2014 m.;9(3):e91962.
 27. Weitz CJ, Miyake Y, Shinzato K, Montag E, Zrenner E, Went LN, ir kt. Human tritanopia associated with two amino acid substitutions in the blue-sensitive opsin. *Am J Hum Genet.* 1992 m. kovo;50(3):498–507.
 28. Kohl S, Varsanyi B, Antunes GA, Baumann B, Hoyng CB, Jägle H, ir kt. CNGB3 mutations account for 50% of all cases with autosomal recessive achromatopsia. *Eur J Hum Genet.* 2005 m. kovo;13(3):302–8.

29. Kohl S, Marx T, Giddings I, Jäggle H, Jacobson SG, Apfelstedt-Sylla E, ir kt. Total colourblindness is caused by mutations in the gene encoding the alpha-subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated cation channel. *Nat Genet.* 1998 m. liepos;19(3):257–9.
30. Kohl S, Baumann B, Rosenberg T, Kellner U, Lorenz B, Vadalà M, ir kt. Mutations in the cone photoreceptor G-protein alpha-subunit gene GNAT2 in patients with achromatopsia. *Am J Hum Genet.* 2002 m. rugpjūčio;71(2):422–5.
31. Kohl S, Coppeters F, Meire F, Schaich S, Roosing S, Brennenstuhl C, ir kt. A nonsense mutation in PDE6H causes autosomal-recessive incomplete achromatopsia. *Am J Hum Genet.* 2012 m. rugsėjo 7 d.;91(3):527–32.
32. Thiadens AAHJ, den Hollander AI, Roosing S, Nabuurs SB, Zekveld-Vroon RC, Collin RWJ, ir kt. Homozygosity mapping reveals PDE6C mutations in patients with early-onset cone photoreceptor disorders. *Am J Hum Genet.* 2009 m. rugpjūčio;85(2):240–7.
33. Weleber RG, Francis PJ, Trzuppek KM, Beattie C. Leber Congenital Amaurosis – RETIRED CHAPTER, FOR HISTORICAL REFERENCE ONLY. Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Gripp KW, ir kt., sudarytojai. *GeneReviews®* [Prieiga per internetą]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [žiūrėta 2023 m. kovo 21 d.]. Adresas: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1298/>
34. Perrault I, Hanein S, Zanlonghi X, Serre V, Nicouleau M, Defoort-Delhemmes S, ir kt. Mutations in NMNAT1 cause Leber congenital amaurosis with early-onset severe macular and optic atrophy. *Nat Genet.* 2012 m. rugsėjo;44(9):975–7.
35. Ai den H, A B, J B, Fp C. Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies. *The Journal of clinical investigation* [Prieiga per internetą]. 2010 m. rugsėjo [žiūrėta 2023 m. kovo 23 d.];120(9). Adresas: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20811160/>
36. van Bokhoven H, Schwartz M, Andréasson S, van den Hurk JA, Bogerd L, Jay M, ir kt. Mutation spectrum in the CHM gene of Danish and Swedish choroideremia patients. *Hum Mol Genet.* 1994 m. liepos;3(7):1047–51.
37. Seabra MC, Brown MS, Goldstein JL. Retinal degeneration in choroideremia: deficiency of rab geranylgeranyl transferase. *Science.* 1993 m. sausio 15 d.;259(5093):377–81.
38. Prem Senthil M, Khadka J, Gilhotra JS, Simon S, Pesudovs K. Exploring the quality of life issues in people with retinal diseases: a qualitative study. *J Patient Rep Outcomes.* 2017 m. rugsėjo 21 d.;1:15.
39. Davies EC, Pineda R. Cataract surgery outcomes and complications in retinal dystrophy patients. *Can J Ophthalmol.* 2017 m. gruodžio;52(6):543–7.
40. Talib M, Boon CJF. Retinal Dystrophies and the Road to Treatment: Clinical Requirements and Considerations. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila).* 2020 m. birželio 4 d.;9(3):159–79.
41. Strong SA, Hirji N, Quartilho A, Kalitzeos A, Michaelides M. Retrospective cohort study exploring whether an association exists between spatial distribution of cystoid spaces in

- cystoid macular oedema secondary to retinitis pigmentosa and response to treatment with carbonic anhydrase inhibitors. *Br J Ophthalmol*. 2019 m. vasario;103(2):233–7.
42. Yuzbasioglu E, Artunay O, Rasier R, Sengul A, Bahcecioglu H. Intravitreal bevacizumab (Avastin) injection in retinitis pigmentosa. *Curr Eye Res*. 2009 m. kovo;34(3):231–7.
 43. Melo GB, Farah ME, Aggio FB. Intravitreal injection of bevacizumab for cystoid macular edema in retinitis pigmentosa. *Acta Ophthalmol Scand*. 2007 m. birželio;85(4):461–3.
 44. Artunay O, Yuzbasioglu E, Rasier R, Sengul A, Bahcecioglu H. Intravitreal ranibizumab in the treatment of cystoid macular edema associated with retinitis pigmentosa. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2009 m. gruodžio;25(6):545–50.
 45. File:Alpha.jpg - EyeWiki [Prieiga per internetą]. [žiūrėta 2023 m. gegužės 16 d.].
Adresas: <https://eyewiki.aao.org/File:Alpha.jpg>
 46. Dhurandhar D, Sahoo NK, Mariappan I, Narayanan R. Gene therapy in retinal diseases: A review. *Indian J Ophthalmol*. 2021 m. rugsėjo;69(9):2257–65.
 47. Trapani I. Adeno-Associated Viral Vectors as a Tool for Large Gene Delivery to the Retina. *Genes*. 2019 m. balandžio;10(4):287.
 48. Cai X, Conley SM, Naash MI. RPE65: role in the visual cycle, human retinal disease, and gene therapy. *Ophthalmic Genet*. 2009 m. birželio;30(2):57–62.
 49. Verma IM, Weitzman MD. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem*. 2005 m.;74:711–38.
 50. Graham FL, Prevec L. Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines. *Biotechnology*. 1992 m.;20:363–90.
 51. Greenberg KP, Lee ES, Schaffer DV, Flannery JG. Gene delivery to the retina using lentiviral vectors. *Adv Exp Med Biol*. 2006 m.;572:255–66.
 52. Han Z, Conley SM, Naash MI. Gene therapy for Stargardt disease associated with ABCA4 gene. *Adv Exp Med Biol*. 2014 m.;801:719–24.
 53. Sun D, Sun W, Gao SQ, Lehrer J, Naderi A, Wei C, ir kt. Effective gene therapy of Stargardt disease with PEG-ECO/pGRK1-ABCA4-S/MAR nanoparticles. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2022 m. rugpjūčio 24 d.;29:823–35.
 54. Sharma J, Paschalis EI. The future of non-viral gene delivery for the treatment of inherited retinal diseases. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2022 m. lapkričio 7 d.;30:354.
 55. Drenser KA, Timmers AM, Hauswirth WW, Lewin AS. Ribozyme-targeted destruction of RNA associated with autosomal-dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998 m. balandžio;39(5):681–9.
 56. Lewin AS, Drenser KA, Hauswirth WW, Nishikawa S, Yasumura D, Flannery JG, ir kt. Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Med*. 1998 m. rugpjūčio;4(8):967–71.

57. O'Neill B, Millington-Ward S, O'Reilly M, Tuohy G, Kiang AS, Kenna PF, ir kt. Ribozyme-based therapeutic approaches for autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 m. rugsėjo;41(10):2863–9.
58. Sullivan JM, Pietras KM, Shin BJ, Misasi JN. Hammerhead ribozymes designed to cleave all human rod opsin mRNAs which cause autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Vis*. 2002 m. balandžio 8 d.;8:102–13.
59. Gorbatyuk MS, Pang JJ, Thomas J, Hauswirth WW, Lewin AS. Knockdown of wild-type mouse rhodopsin using an AAV vectored ribozyme as part of an RNA replacement approach. *Mol Vis*. 2005 m. rugpjūčio 29 d.;11:648–56.
60. O'Reilly M, Palfi A, Chadderton N, Millington-Ward S, Ader M, Cronin T, ir kt. RNA interference-mediated suppression and replacement of human rhodopsin in vivo. *Am J Hum Genet*. 2007 m. liepos;81(1):127–35.
61. Mao H, Gorbatyuk MS, Rossmiller B, Hauswirth WW, Lewin AS. Long-Term Rescue of Retinal Structure and Function by Rhodopsin RNA Replacement with a Single Adeno-Associated Viral Vector in P23H RHO Transgenic Mice. *Hum Gene Ther*. 2012 m. balandžio;23(4):356–66.
62. Palfi A, Ader M, Kiang AS, Millington-Ward S, Clark G, O'Reilly M, ir kt. RNAi-based suppression and replacement of rds-peripherin in retinal organotypic culture. *Hum Mutat*. 2006 m. kovo;27(3):260–8.
63. Petrs-Silva H, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM, Lewin AS, Hauswirth WW. Suppression of rds expression by siRNA and gene replacement strategies for gene therapy using rAAV vector. *Adv Exp Med Biol*. 2012 m.;723:215–23.
64. Rowe-Rendleman CL, Durazo SA, Kompella UB, Rittenhouse KD, Di Polo A, Weiner AL, ir kt. Drug and gene delivery to the back of the eye: from bench to bedside. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 m. balandžio 28 d.;55(4):2714–30.
65. Gérard X, Perrault I, Munnich A, Kaplan J, Rozet JM. Intravitreal Injection of Splice-switching Oligonucleotides to Manipulate Splicing in Retinal Cells. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015 m. rugsėjo 1 d.;4(9):e250.
66. Murray SF, Jazayeri A, Matthes MT, Yasumura D, Yang H, Peralta R, ir kt. Allele-Specific Inhibition of Rhodopsin With an Antisense Oligonucleotide Slows Photoreceptor Cell Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015 m. spalio;56(11):6362–75.
67. Garanto A, Chung DC, Duijkers L, Corral-Serrano JC, Messchaert M, Xiao R, ir kt. In vitro and in vivo rescue of aberrant splicing in CEP290-associated LCA by antisense oligonucleotide delivery. *Hum Mol Genet*. 2016 m. birželio 15 d.;25(12):2552–63.
68. Pulman J, Sahel JA, Dalkara D. New Editing Tools for Gene Therapy in Inherited Retinal Dystrophies. *CRISPR J*. 2022 m. birželio 1 d.;5(3):377–88.
69. Maguire AM, Bennett J, Aleman EM, Leroy BP, Aleman TS. Clinical Perspective: Treating RPE65-Associated Retinal Dystrophy. *Mol Ther*. 2021 m. vasario 3 d.;29(2):442–63.

70. Current Clinical Applications of In Vivo Gene Therapy with AAVs - PubMed [Prieiga per internetą]. [žiūrėta 2023 m. balandžio 20 d.]. Adresas: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33309881/>
71. luxturna-epar-medicine-overview_en.pdf [Prieiga per internetą]. [žiūrėta 2023 m. balandžio 21 d.]. Adresas: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/luxturna-epar-medicine-overview_en.pdf
72. Medical breakthrough: Seattle man is first adult to get new gene therapy for vision | The Spokesman-Review [Prieiga per internetą]. [žiūrėta 2023 m. gegužės 16 d.]. Adresas: <https://www.spokesman.com/stories/2018/apr/01/medical-breakthrough-seattle-man-is-first-adult-to/>