



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΒΑΣΙΚΩΝ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ/ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

(ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ)

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑΚΗ ΕΚΦΥΛΙΣΗ ΤΗΣ
ΩΧΡΑΣ ΚΗΛΙΔΑΣ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ.**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΓΟΡΓΟΛΗ, MD, FEBOphth

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΑΓΓΕΛΙΔΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΒΑΣΙΚΩΝ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ/ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

(ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ)

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑΚΗ ΕΚΦΥΛΙΣΗ ΤΗΣ
ΩΧΡΑΣ ΚΗΛΙΔΑΣ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ.**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΓΟΡΓΟΛΗ, MD, FEBOphth

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΑΓΓΕΛΙΔΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021

Η έγκριση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Όνομα : Κωνσταντίνα Γοργόλη

Τίτλος : Εφαρμογές της αναγεννητικής ιατρικής στην ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας του αμφιβληστροειδούς.

Ημερομηνία παρουσίασης : 12 Ιουλίου 2021

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή Αξιολόγησης:

1. Επιβλέπων: Χαράλαμπος Αγγελίδης, Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Μέλος επιτροπής: Πατρώνα Βεζυράκη, Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Μέλος επιτροπής: Μαρίκα Σύρρου, Καθηγήτρια Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Αφιερώσεις

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία ειδίκευσης εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών “Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες” με κατεύθυνση “Βλαστικά κύτταρα και Κυτταρική/Γονιδιακή θεραπεία” του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021.

Επιβλέπων ήταν ο κ. Χαράλαμπος Αγγελίδης, Καθηγητής Βιολογίας και διευθυντής του Εργαστηρίου Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στον οποίο οφείλω ιδιαίτερες ευχαριστίες για την επίβλεψη του θέματος της μεταπτυχιακής μου εργασίας ειδίκευσης.

Πολλά ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω και στα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: την κ. Πατρώνα Βεζυράκη, Καθηγήτρια Φυσιολογίας και διευθύντρια του Εργαστηρίου Φυσιολογίας του Τμήματος της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για το αμέριστο ενδιαφέρον της, τον άριστο συντονισμό και τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδωσε καθ’ όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού και την κ. Μαρίκα Σύρρου, Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την πολύτιμη βοήθεια της.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον σύζυγό μου Ανδρέα Κατσάνο, Αναπληρωτή Καθηγητή Οφθαλμολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, που με παρότρυνε να συμμετέχω στο Μεταπτυχιακό αυτό πρόγραμμα, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του κατά τη συγγραφή της μεταπτυχιακής εργασίας ειδίκευσης.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση που έδειξε καθ’ όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ιωάννινα, Μάιος 2021

Κωνσταντίνα Γοργόλη, MD, FEBOphth

Οφθαλμίατρος

Πρόλογος

Η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας του αμφιβληστροειδούς αποτελεί την κύρια αιτία μη αναστρέψιμης τύφλωσης σε άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών στο δυτικό κόσμο. Ο επιπολασμός της νόσου αναμένεται να αυξηθεί τα επόμενα χρόνια λόγω της γήρανσης του πληθυσμού παγκοσμίως.

Μέχρι το 2006 δεν υπήρχε αποτελεσματική θεραπεία για τη νόσο. Σήμερα, για τη νεοαγγειακή μορφή της νόσου η θεραπεία εκλογής είναι οι anti-VEGF παράγοντες που πρέπει να επαναλαμβάνονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Η εύρεση νέων, καινοτόμων και μακροχρόνιων θεραπειών είναι απαραίτητη για την αντιμετώπιση της νόσου. Η χρήση των βλαστικών κυττάρων και της γονιδιακής θεραπείας διαφαίνεται αρκετά ελπιδοφόρα και οι πρώτες κλινικές μελέτες τεκμηριώνουν την ασφάλεια αυτών των νέων θεραπειών.

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία αποτελεί μια αναδρομική, συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για την εφαρμογή της αναγεννητικής ιατρικής, τόσο των βλαστικών κυττάρων όσο και της γονιδιακής θεραπείας, για την θεραπεία της ηλικιακής εκφύλισης του αμφιβληστροειδούς.

Πίνακας Περιεχομένων

1. Εισαγωγή	10
1.1 Ανατομία του οφθαλμού	10
1.2 Δομή του Αμφιβληστροειδούς	13
1.2.1 Μελάχρουον επιθήλιο	13
1.2.2 Νευροαμφιβληστροειδής	18
1.3 Οφθαλμού	21
Εμβρυολογία	του
2. Η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας του αμφιβληστροειδούς	
2.1 Παθοφυσιολογία	26
2.2 Κλινικές Μορφές	28
2.3 Η αγγειογένεση στην ηλικιακή εκφύλιση του αμφ/δούς	32
2.4 Παράγοντες κινδύνου	33
2.5 Συμπτωματολογία	33
2.6 Διάγνωση	34
2.7 Θεραπεία	38
3. Η χρήση βλαστικών κυττάρων για την ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας του αμφιβληστροειδούς	
3.1 Εισαγωγή	41
3.2 Η κυτταρική θεραπεία (cell therapy) της AMD- Μηχανισμοί δράσης	41
3.3 Ο οφθαλμός ως όργανο-στόχος για την εφαρμογή κυτταρικών θεραπειών	43
3.4 Μεταμόσχευση κυττάρων μελαγχρόου επιθηλίου RPE	43
3.5 Μεταμόσχευση φωτοϋποδοχέων	45
3.6 Πηγές κυττάρων για μεταμόσχευση	46

3.7 Πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (Pluripotent stem cells, PSCs).....	47
3.8 Διαφοροποίηση PSCs προς κύτταρα RPE και φωτούποδοχείς.....	51
3.9 Τρισδιάστατες καλλιέργειες αμφιβληστροειδούς (Three-dimensional 3D retinal cultures).....	55
3.10 Χαρακτηριστικά του RPE.....	59
3.11 Πρωτόκολλα διαφοροποίησης του RPE.....	62
3.12 Στρατηγικές χορήγησης του RPE που προέρχεται από PSCs.....	67
3.13 Κλινικές μελέτες.....	73
3.14 Απόρριψη μοσχεύματος.....	78
3.15 Βλαστικά κύτταρα-Συμπέρασμα.....	79
4. Η χρήση γονιδιακής θεραπείας για την ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας του αμφιβληστροειδούς.....	81
4.1 Εισαγωγή.....	81
4.2 Μοριακή βάση της αγγειογένεσης στην AMD.....	83
4.3 Πλεονεκτήματα του οφθαλμού για τη χρήση της γονιδιακής θεραπείας.....	85
4.4 Τύποι γονιδιακής θεραπείας.....	86
4.5 Ιικοί φορείς (Viral vectors).....	89
4.6 Οδοί χορήγησης του ιικού φορέα.....	91
4.7 Γονιδιακές θεραπείες για την AMD.....	93

Συμπέρασμα.....	101
5.Περίληψη στην Ελληνική.....	103
6. Summary in English.....	104
7. Βιβλιογραφία.....	105

1. Εισαγωγή

1.1 Ανατομία του οφθαλμού

Ο οφθαλμός αποτελεί ένα όργανο σφαιρικού σχήματος και είναι υπεύθυνος για την αίσθηση της όρασης. Βρίσκεται εντός μιας οστέινης κοιλότητας του προσωπικού κρανίου που ονομάζεται οφθαλμικός κόγχος.

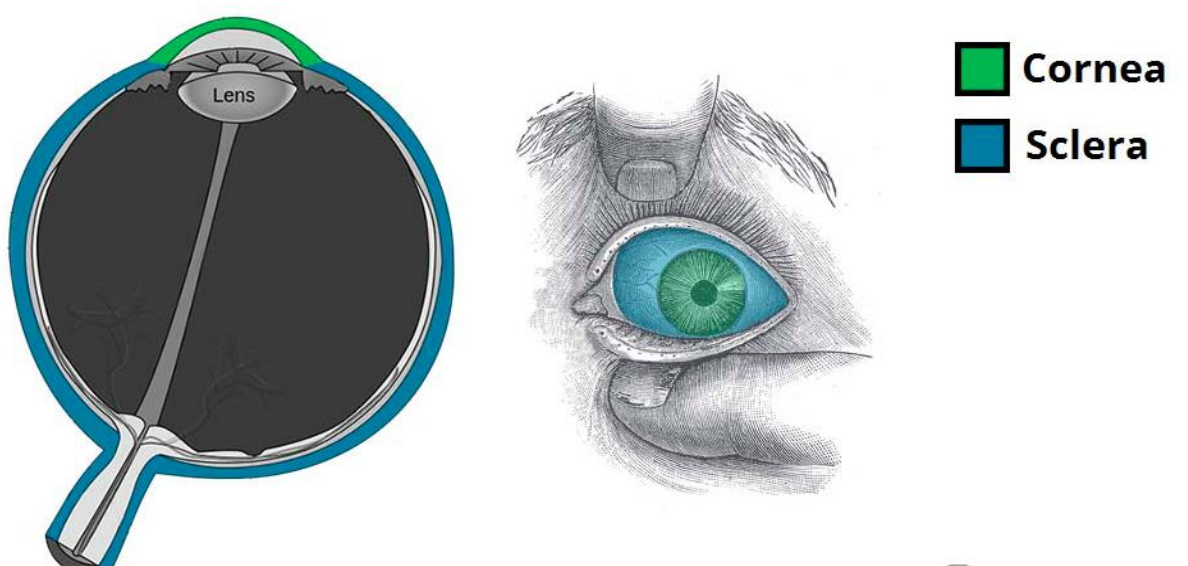
Ανατομικά ο οφθαλμικός βολβός χωρίζεται σε 3 στιβάδες: την ινώδη, την αγγειώδη και την νευρική. Κάθε μια από αυτές τις στιβάδες έχει διαφορετική δομή και λειτουργία.

A. Ινώδης χιτώνας

Ο ινώδης χιτώνας είναι η εξωτερική στιβάδα του οφθαλμού και αποτελείται από τον σκληρό (sclera) και τον κερατοειδή (cornea) που συνέχονται μεταξύ τους. Η κύρια λειτουργία τους είναι να δίνουν σχήμα στον οφθαλμό και να παρέχουν στήριξη στις εσωτερικές δομές του.

Ο σκληρός αποτελεί το 85% του ινώδους χιτώνα και έχει χρώμα λευκό. Σε αυτόν καταφύονται οι οφθαλμοκινητικοί μύες.

Ο κερατοειδής είναι διαυγής και βρίσκεται στο πρόσθιο τμήμα του οφθαλμού. Οι ακτίνες του φωτός που εισέρχονται στον οφθαλμό, υφίστανται διάθλαση στον κερατοειδή. (Εικόνα 1)

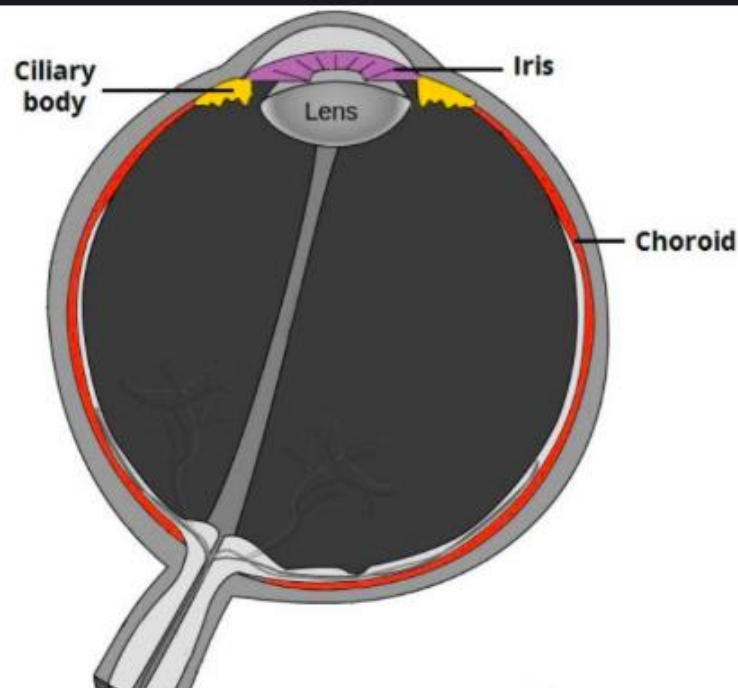


Εικόνα 1: Ινώδης χιτώνας του οφθαλμού (ο κερατοειδής με πράσινο χρώμα και ο σκληρός με μπλε).

B. Αγγειώδης χιτώνας

Ο αγγειώδης χιτώνας βρίσκεται εσωτερικά του ινώδους και αποτελείται από τον χοριοειδή, το ακτινωτό σώμα και την ίριδα.

Ο χοριοειδής (choroid) αποτελείται από συνδετικό ιστό και αιμοφόρα αγγεία. Παρέχει θρεπτικά συστατικά στις εξωτερικές στιβάδες του αμφιβληστροειδούς. Το ακτινωτό σώμα (ciliary body) αποτελείται από 2 μέρη, τον ακτινωτό μυ και τις ακτινοειδείς προσεκβολές. Ο ακτινωτός μυς, που αποτελείται από λείες μυϊκές ίνες, συνδέεται με το φακό μέσω των ακτινοειδών προσεκβολών. Το ακτινωτό σώμα διαμορφώνει το σχήμα του φακού και συμβάλλει στην παραγωγή του υδατοειδούς υγρού. Η ίριδα (iris) είναι μια κυκλική δομή με μια οπή στο κέντρο, την κόρη. Η σύσπαση των λείων μυϊκών ινών της ίριδας αλλάζει τη διάμετρο της κόρης. Η ίριδα βρίσκεται μεταξύ του κερατοειδούς και του φακού. (Εικόνα 2)

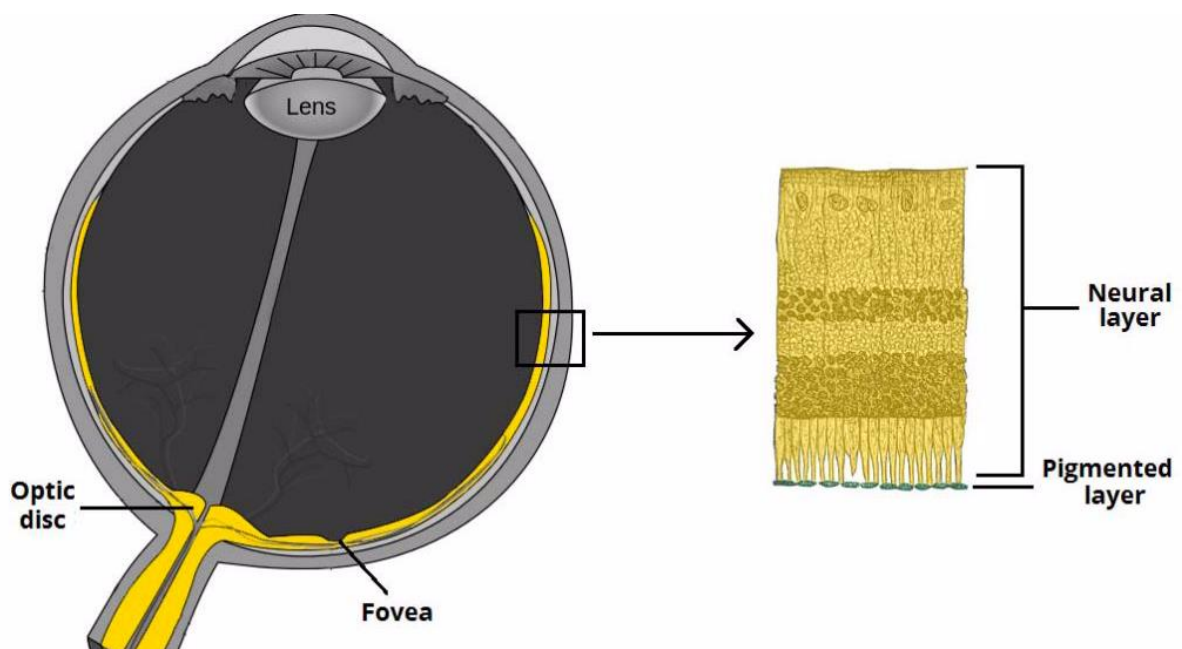


Εικόνα 2 : Ο αγγειώδης χιτώνας (ο χοριοειδής με το κόκκινο, το ακτινωτό σώμα με το κίτρινο και η ίριδα με το μωβ χρώμα)

Γ. Νευρικός χιτώνας

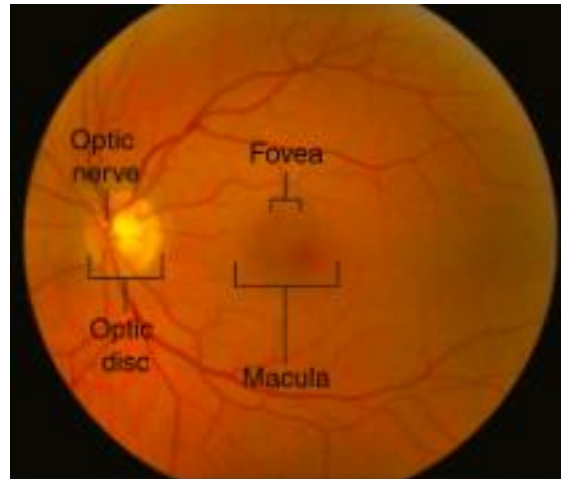
Ο εσωτερικός νευρικός χιτώνας του οφθαλμού αποτελείται από τον αμφιβληστροειδή (retina) ο οποίος ανιχνεύει το φωτεινό ερέθισμα. Ο αμφιβληστροειδής αποτελείται από 2 στιβάδες:

- Η εξωτερική στιβάδα των κυττάρων του μελαγχρόου επιθηλίου (retinal pigment epithelium). Πρόκειται για μια μονή στιβάδα κυττάρων που περιέχουν χρωστική. Βρίσκεται μεταξύ του νευροαμφιβληστροειδούς και του χοριοειδή. Το μελάγχρουν επιθήλιο εμποδίζει τη σκέδαση του φωτός στους υπόλοιπους ιστούς του οφθαλμού.
- Η εσωτερική στιβάδα του αμφιβληστροειδούς (neurosensory retina). Σε αυτήν βρίσκονται οι φωτοϋποδοχείς (ραβδία και κωνία) που μετατρέπουν την φωτεινή πληροφορία σε νευρικό ερέθισμα. (Εικόνα 3)



Εικόνα 3: Ο νευρικός χιτώνας του οφθαλμού (κίτρινο χρώμα)

Περίπου στο κέντρο του αμφιβληστροειδούς βρίσκεται η ωχρά κηλίδα (macula) η οποία έχει αρκετή χρωστική και φαίνεται κιτρινωπή κατά την οφθαλμοσκόπηση. Στο κέντρο της φέρει ένα εντύπωμα, το κεντρικό βοθρίο (fovea) όπου η πυκνότητα των φωτοϋποδοχέων είναι μέγιστη. Η περιοχή αυτή αντιστοιχεί στο κέντρο της κοντινής όρασης. Στον οπτικό δίσκο (optic disc) συγκεντρώνονται όλες οι νευρικές ίνες από τον αμφιβληστροειδή και σχηματίζουν το οπτικό νεύρο (optic nerve) ενώ απουσιάζουν παντελώς οι φωτοϋποδοχείς. (Εικόνα 4)



Εικόνα 4: Οφθαλμοσκοπική εικόνα του αμφιβληστροειδούς του ΑΟ. Φαίνεται η περιοχή της ωχράς (macula) και του κεντρικού βοθρίου (fovea) που ευθύνονται για την κεντρική όραση. Ο οπτικός δίσκος (Optic disc) αποτελείται από νευρικές ίνες και από αυτόν εξορμούνται τα κεντρικά αγγεία του αμφιβληστροειδούς (κεντρική αρτηρία και φλέβα).

1.2 Δομή του Αμφιβληστροειδούς

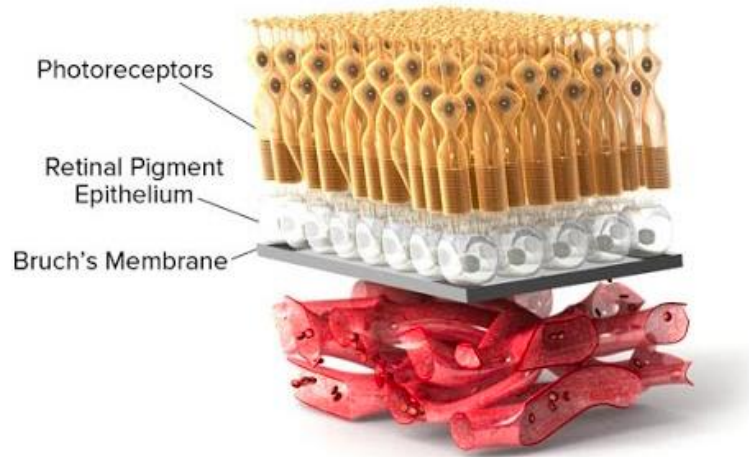
1.2.1 Το μελάγχρουν επιθήλιο

Το **μελάγχρουν επιθήλιο (retinal pigment epithelium, RPE)** αποτελείται από μια μονή στιβάδα εξειδικευμένων χρωστικοφόρων κυβοειδών κυττάρων εξωδερματικής προέλευσης. Βρίσκεται ανάμεσα από τον αγγειώδη χοριοειδή και τον νευροαμφιβληστροειδή. (Εικόνα 5)

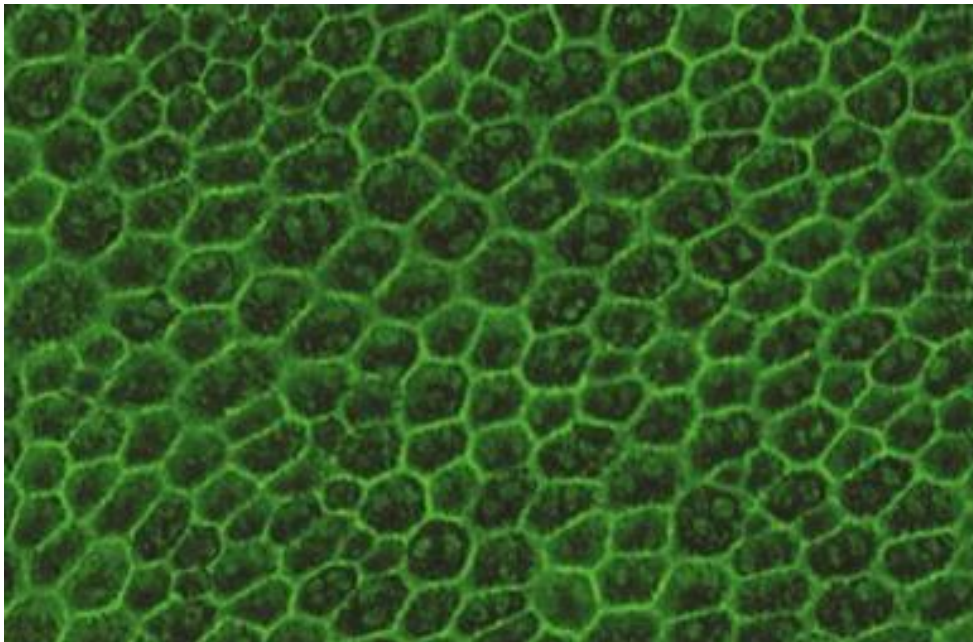
Εξωτερικά το RPE επικάθεται με στενές συνάψεις πάνω στη μεμβράνη του Bruch (Bruch's membrane) η οποία αποτελείται από κολλαγόνο και ελαστίνη. Εξωτερικά της μεμβράνης του Bruch βρίσκονται τα χοριοτριχοειδή (choriocapillaries), μικρού διαμετρήματος αγγεία του χοριοειδούς.

Εσωτερικά τα κύτταρα του RPE έρχονται σε επαφή με τα έξω τμήματα των φωτοϋποδοχέων (photoreceptor outer segments).

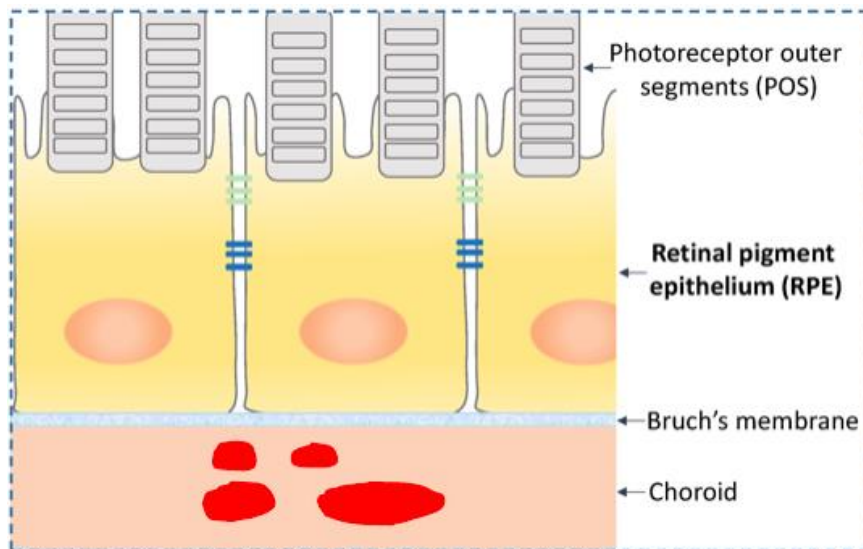
Ο ανθρώπινος αμφιβληστροειδής περιέχει περίπου 3.5×10^6 κύτταρα του RPE τα οποία μένουν σχετικά σταθερά σε αριθμό σε νεαρούς ενήλικες. Μορφολογικά έχουν κυβικό σχήμα, ο πυρήνας τους βρίσκεται στη βάση του κυττάρου και περιέχουν κοκκία χρωστικής (μελανίνης) στο κυτταρόπλασμά τους. Η παρουσία μελανίνης προσδίδει στα κύτταρα του RPE καφέ χρώμα. (Εικόνα 6) Η κορυφή τους εμφανίζει μικρολάχνες μεγέθους 3-7 μm που διαπλέκονται με τα εξωτερικά τμήματα των φωτοϋποδοχέων. (Εικόνα 7) (Strauss O. 2011)



Εικόνα 5: Τοπογραφία του μελαγχρόου επιθηλίου.



Εικόνα 6: Καλλιεργημένα ανθρώπινα κύτταρα RPE, μια μονή στιβάδα πολυγωνικών κυττάρων (phase microscopy x25)



Εικόνα 7: Μορφολογία κυττάρου RPE

Η **πολικότητα των κυττάρων του RPE** χαρακτηρίζεται από διακριτές και εξειδικευμένες λειτουργίες της κορυφής και της βάσης τους. Τα κύτταρα του RPE εμφανίζουν διαφορετικές πρωτεΐνες στην κορυφή, στην πλάγια επιφάνεια και στη βάση τους. (Πίνακας 1)

Στην κορυφή συναντώνται κυρίως πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεταφορά ιόντων και θρεπτικών ουσιών (πχ. Na^+/K^+ ATPάση, μεταφορείς γλυκόζης GLUT1), δομικές πρωτεΐνες των μικρολαχνών και πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη φαγοκυττάρωση των εξωτερικών τμημάτων των φωτοϋποδοχέων.

Η πλάγια επιφάνεια φέρει πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο σχηματισμό στενών συνδέσεων με τα γειτονικά κύτταρα (πχ. Καντερίνες).

Η βασική πλευρά επίσης διαθέτει πρωτεΐνες πρόσφυσης με τη μεμβράνη του Bruch, μεταφορείς γλυκόζης και ιόντων.

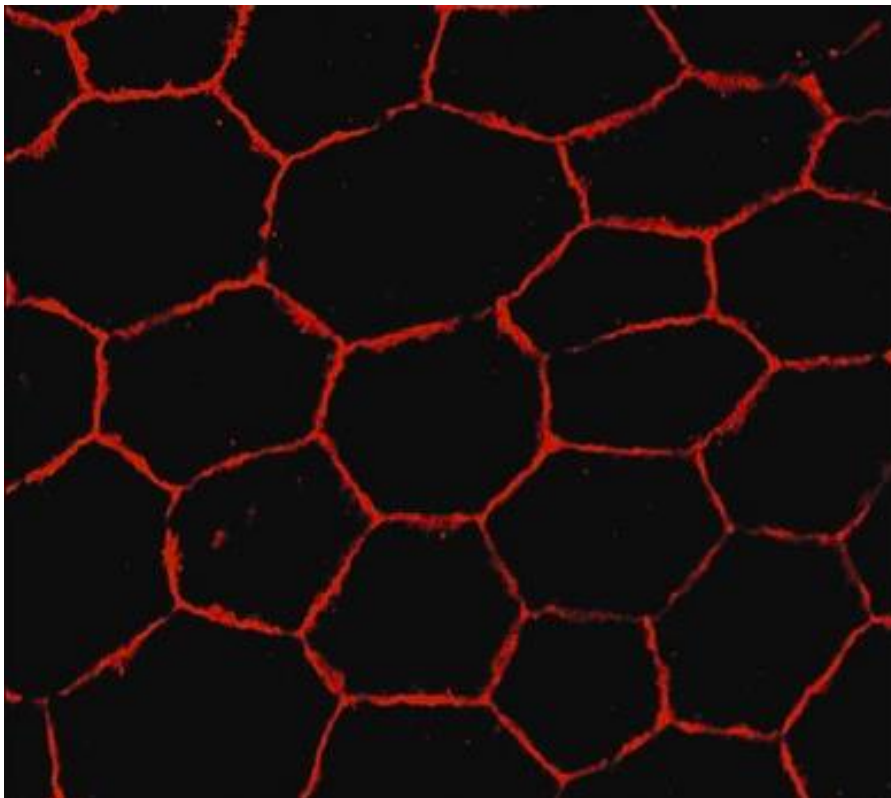
Στο κύτταρο του RPE, εμφανίζεται πολικότητα και στη διάταξη των οργανιδίων. Τα κοκκία μελανίνης βρίσκονται εντός του κυτταροπλάσματος της κορυφιαίας επιφάνειας. Τα μιτοχόνδρια αντιθέτως βρίσκονται στη βασική πλευρά του κυττάρου κοντά στα αγγεία του χοριοειδούς που είναι πλούσια σε οξυγόνο.

Ο **έξω αιματοαμφιβληστροειδικός φραγμός** δημιουργείται από τα κύτταρα του RPE, στα οποία οι πλευρικές επιφάνειες συνδέονται στενά μεταξύ τους με στενές συνάψεις (tight junctions, adherens junctions). Η στενή αυτή σύνδεση των γειτονικών κυττάρων δημιουργεί ένα φραγμό και ελέγχει τη διάχυση ουσιών στον χώρο μεταξύ των κυττάρων. (Εικόνα 8)

Location	Protein	Function
Apical membrane	Na/K-ATPase	Na flux
	N-CAM	Adhesion to retina, phagocytosis
	$\alpha\beta 5$ Integrin	Phagocytosis
	CD36	Phagocytosis
	Ezrin	Apical microvilli
	CLIC4	Channels/transporters
	GLUT1	Glucose transport
Lateral membrane	MCT1	Monocarboxylate transporter
	Occludin	Tight junction
	Cadherin	Adherens junction
Basolateral membrane	Connexin	Gap junction
	$\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha\beta 3$ integrin	Attachment to Bruch's membrane
	Ezrin	Basal infoldings
	GLUT1	Glucose transport
	MCT3	Monocarboxylate transporter
	Bestrophin-1	Chloride anion channel

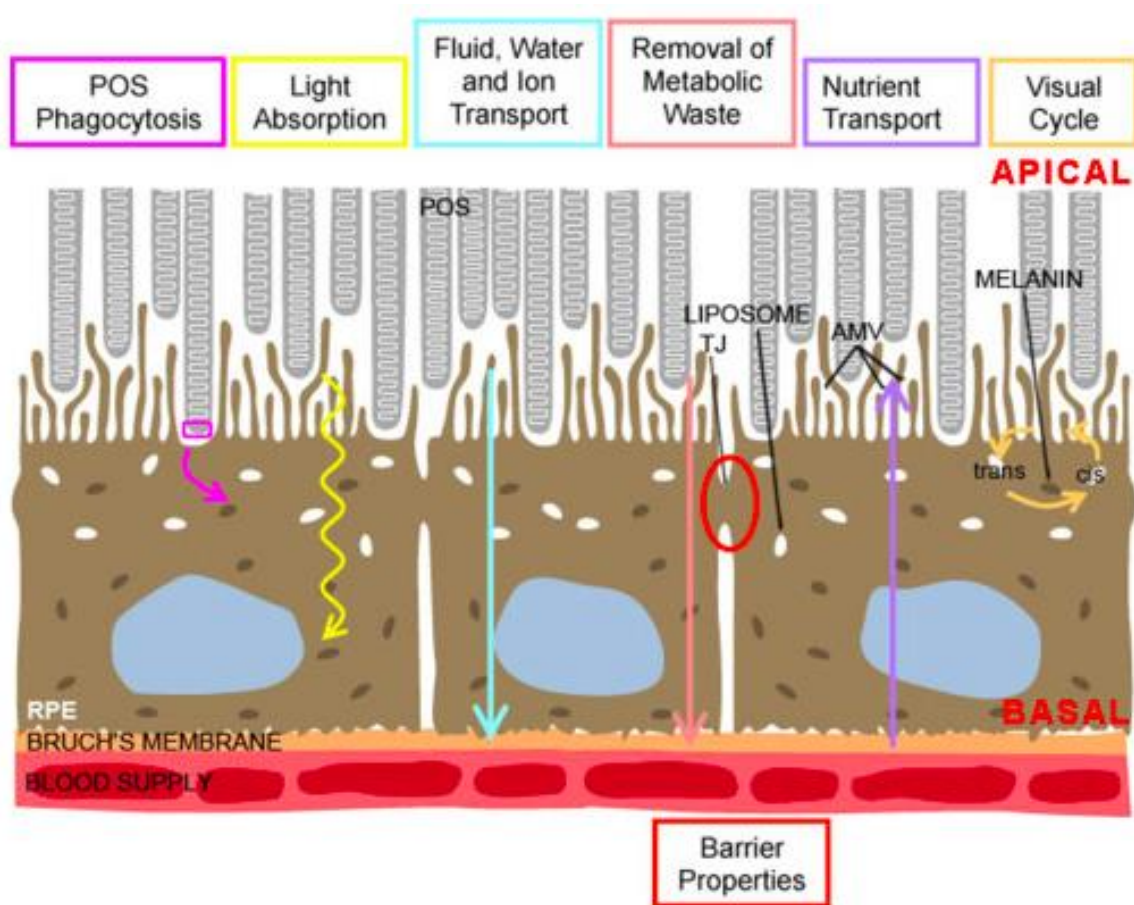
Na/K-ATPase, Na/K adenosine triphosphatase; N-CAM, neural cell adhesion molecule; CLIC4, chloride intracellular channel 4; GLUT1, glucose transporter 1; MCT1, monocarboxylate transporter 1.

Πίνακας 1: Βασικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες των κυττάρων του μελαγχρόου επιθηλίου



Εικόνα 8: Ανοσοφθορισμός κυττάρων RPE βοοειδούς. Χρώση με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης ZO-1, μιας πρωτεΐνης που σχετίζεται με τις στενές συνάψεις ή τις ζώνες αποκλεισμού. Αναδεικνύεται το πολυγωνικό σχήμα και οι στενές συνάψεις μεταξύ των κυττάρων του RPE.

Οι βασικές λειτουργίες του μελαγχρόου επιθηλίου είναι οι εξής:

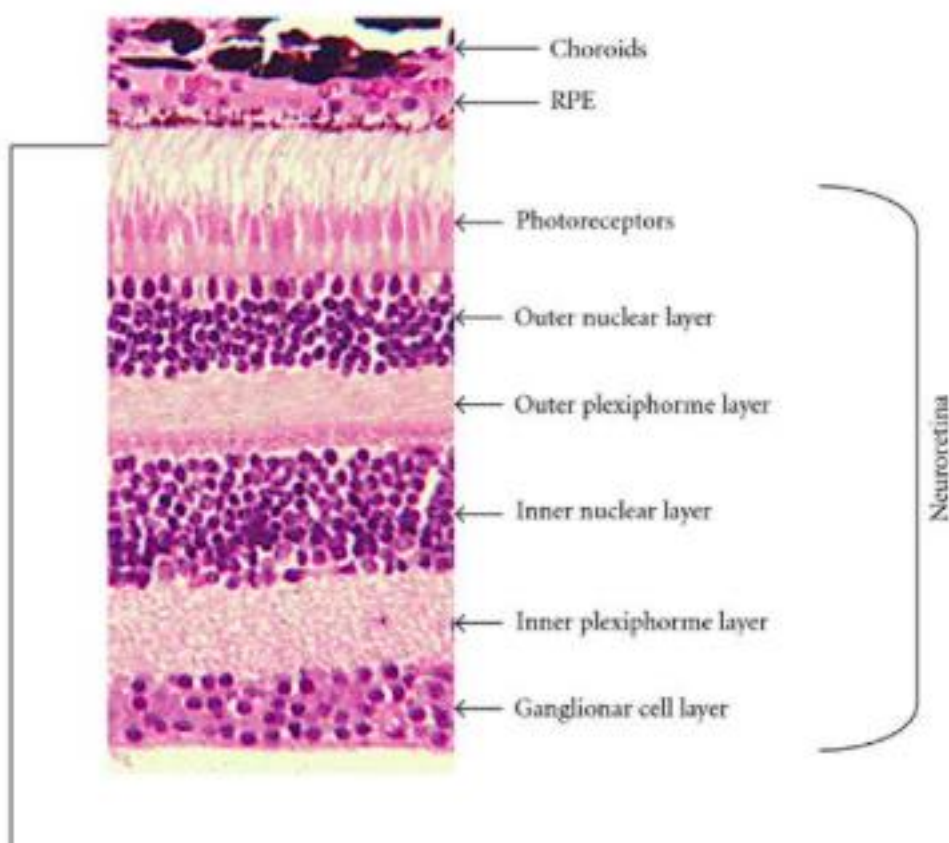


Εικόνα 9: Λειτουργίες του μελαγχρόου επιθηλίου

- Φαγοκυττάρωση των εξωτερικών τμημάτων των φωτοϋποδοχέων / Ανανέωση φωτοϋποδοχέων.
- Απορρόφηση του σκεδαζόμενου φωτός και προστασία ιστών από τη βλαπτική δράση του φωτός.
- Μεταφορά νερού και ιόντων.
- Απομάκρυνση άχρηστων προϊόντων μεταβολισμού του αμφιβληστροειδούς.
- Μεταφορά θρεπτικών συστατικών από τα αιμοφόρα αγγεία του χοριοειδούς στον αμφιβληστροειδή.
- Ιδιότητες φραγμού, η στενή σύνδεση των κυττάρων του RPE αποτελεί τον έξω αιματοαμφιβληστροειδικό φραγμό.
- Συμμετοχή στον κύκλο της όρασης με τη μετατροπή (επαν-ισομερισμός) της trans ρετινάλης στη cis μορφή.

- Έκκριση ουσιών και αυξητικών παραγόντων βασικών για την ομοιόσταση του αμφιβληστροειδούς όπως fibroblast growth factor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF).
- Πρόσφυση του νευροαισθητηριακού αμφιβληστροειδούς στους υποκείμενους ιστούς.
- Παροχή ανοσολογικής ανοχής (immune privilege of the eye). Ο αμφιβληστροειδής είναι ένας ιστός ο οποίος δεν έρχεται σε επαφή με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού του αίματος. Τα κύτταρα του RPE καταρχήν δημιουργούν ένα μηχανικό φραγμό μεταξύ του νευροαμφιβληστροειδούς και της αιματικής κυκλοφορίας. Επίσης τα κύτταρα του μελαγχρόου επιθηλίου επικοινωνούν με το ανοσοποιητικό σύστημα και αποσιωπούν την ανοσολογική απόκριση στον υγιή οφθαλμό. Αντιθέτως σε περίπτωση νόσου, εκκρίνουν ανοσορρυθμιστικά μόρια όπως interleukin-8 (IL-8), Complement factor H (CFH) και ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό. (Εικόνα 9) (Strauss O. 2011)

1.2.2 Ο νευροαμφιβληστροειδής

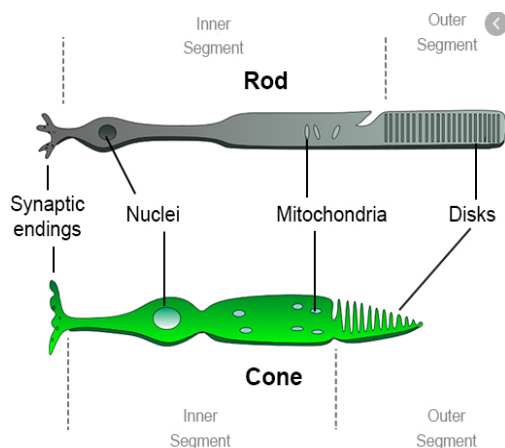


Εικόνα 10: Ιστολογική εικόνα του αμφιβληστροειδούς

Ο νευροαμφιβληστροειδής είναι ένας νευρικός ιστός που αποτελείται από 7 διακριτές στιβάδες:

1. Στιβάδα των φωτοϋποδοχέων (photoreceptor layer)
2. Έξω πυρηνική στιβάδα (outer nuclear)
3. Έξω δικτυωτή στιβάδα (outer plexiform)
4. Έσω πυρηνική στιβάδα (inner nuclear)
5. Έσω δικτυωτή στιβάδα (inner plexiform)
6. Στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων (ganglion cell layer)
7. Στιβάδα των αμφιβληστροειδικών νευρικών ινών (retinal nerve fiber layer, RNFL) (Εικόνα 10)

Οι φωτοϋποδοχείς είναι εξειδικευμένα αισθητικά κύτταρα που ανιχνεύουν το οπτικό ερέθισμα υπό τη μορφή φωτονίων και στη συνέχεια το μετατρέπουν σε νευρικό. Υπάρχουν 2 διαφορετικά είδη φωτοϋποδοχέων: τα ραβδία και τα κωνία (Εικόνα 11). Τα ραβδία έχουν μεγάλη ευαισθησία στο φωτεινό ερέθισμα και ευθύνονται για τη νυκτερινή όραση. Αντιθέτως, τα κωνία ευθύνονται για την υψηλής ευκρίνειας έγχρωμη όραση. Υπάρχουν 3 είδη κωνίων που ανιχνεύουν διαφορετικά μήκη κύματος του ορατού φωτός: τα S-cones, τα M-cones και τα L-cones ανάλογα με το αν ανιχνεύουν μικρά (short), μεσαία (medium) ή μεγάλα (long) μήκη κύματος. (Εικόνα 12)

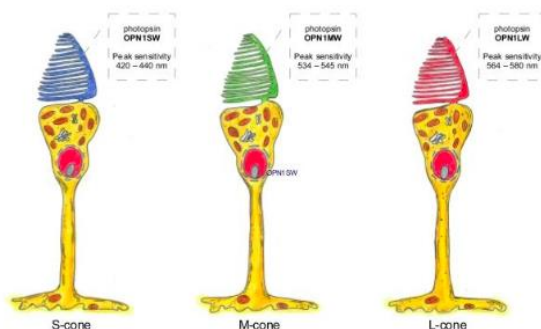


Εικόνα 11: Δομή ραβδίων και κωνίων

Οι φωτοϋποδοχείς συνάπτονται στη συνέχεια με τα δίπολα κύτταρα στην έξω δικτυωτή στιβάδα. Τα ραβδία συνήθως συνάπτονται με ξεχωριστά δίπολα από τα κωνία.

Με τη σειρά τους τα δίπολα συνάπτονται με τα γαγγλιακά κύτταρα στην έσω δικτυωτή στιβάδα. Οι νευράξονες των γαγγλιακών κυττάρων σχηματίζουν τη στιβάδα των νευρικών ινών και κατευθύνονται προς τον οπτικό δίσκο όπου θα σχηματίσουν το οπτικό νεύρο και θα μεταφέρουν το

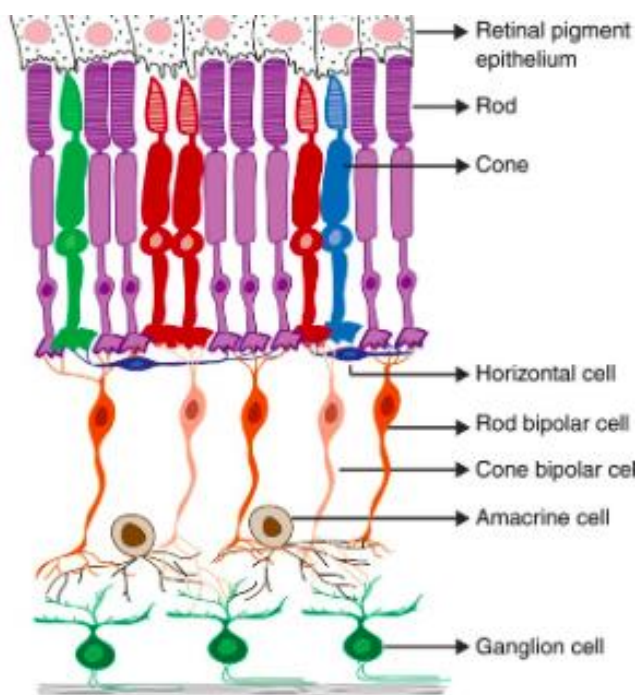
CONE CELLS SUBTYPES



Εικόνα 12: Είδη κωνίων

αισθητικό οπτικό ερέθισμα στον οπτικό φλοιό προς επεξεργασία.

Στον αμφιβληστροειδή, το οπτικό ερέθισμα ανιχνεύεται από τον φωτοϋποδοχέα και στη συνέχεια η πληροφορία μεταφέρεται στο δίπολο και στο γαγγλιακό κύτταρο. Υπάρχουν όμως τα οριζόντια και τα αμακρινή κύτταρα που είναι ενδιάμεσοι νευρώνες και ρυθμίζουν τη ροή της οπτικής πληροφορίας από τους φωτοϋποδοχείς στα δίπολα και από τα δίπολα στα γαγγλιακά αντιστοίχως. (Εικόνα 13) (Hoon M et al, 2014)



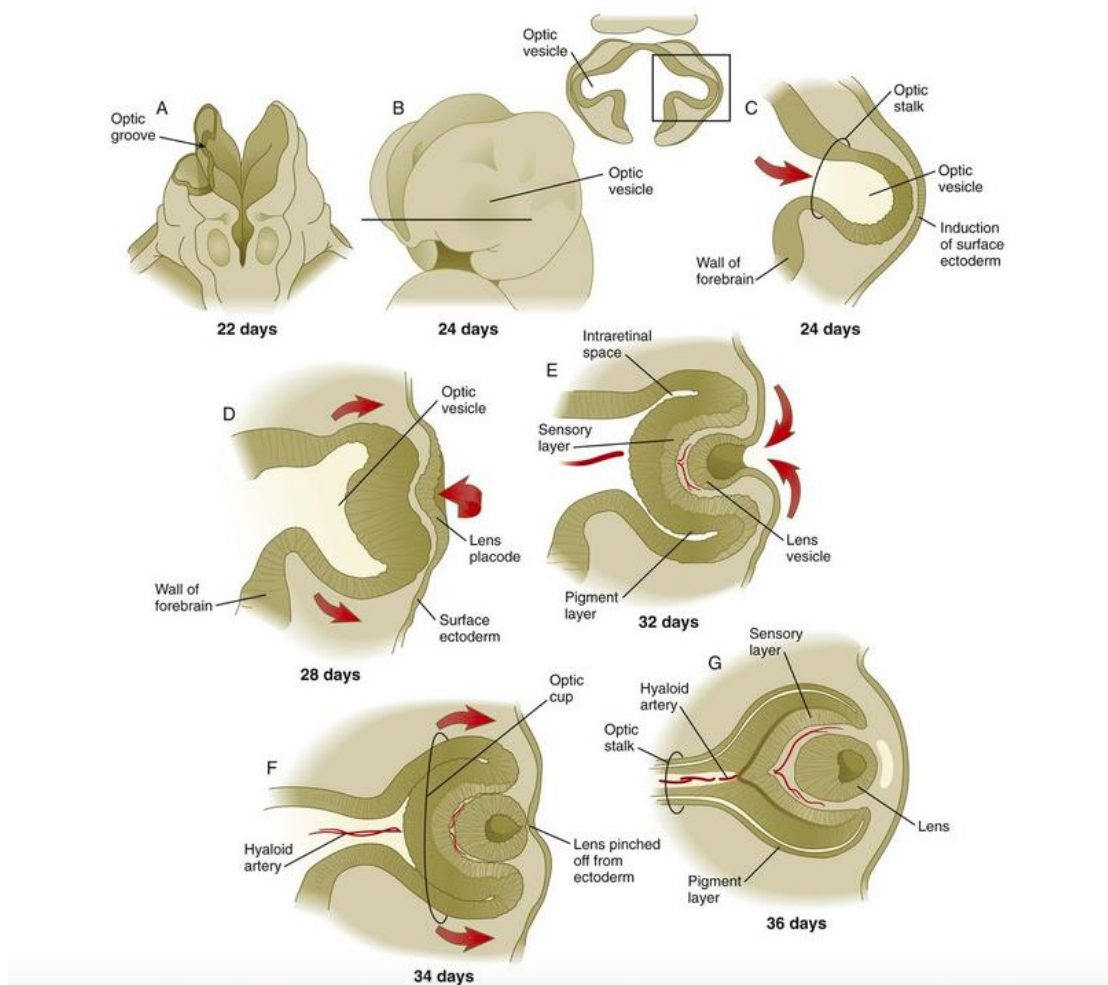
Εικόνα 13: Διαφορετικά είδη κυττάρων του αμφιβληστροειδούς

1.3 Εμβρυολογία του οφθαλμού

Ο οφθαλμός αρχίζει να σχηματίζεται περίπου την 3^η εβδομάδα της ενδομήτριας ζωής. Όλοι οι ιστοί του οφθαλμού είναι είτε εξωδερμικής είτε μεσοδερμικής προέλευσης.

- Ο αμφιβληστροειδής, το ακτινωτό σώμα, το οπτικό νεύρο και η ίριδα προέρχονται από το **νευροεξώδερμα**.
- Ο κρυσταλλοειδής φακός, το επιθήλιο του κερατοειδούς και τα βλέφαρα προέρχονται από το **επιφανειακό εξώδερμα**.
- Ο σκληρός, τα αιμοφόρα αγγεία, οι οφθαλμοκινητικοί μύες, το υαλοειδές, το στρώμα και το ενδοθήλιο του κερατοειδούς προέρχονται από το **περιοφθαλμικό μεσέγχυμα**.

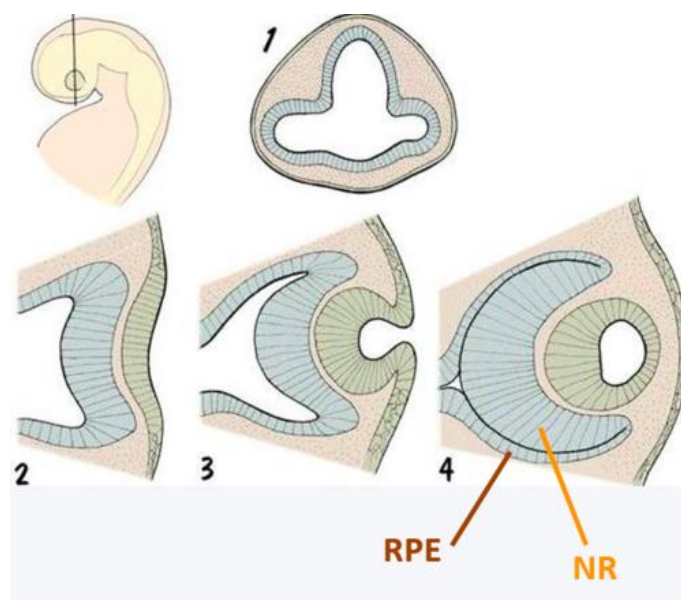
Το ομοιοτικό γονίδιο Pax6 (homeobox gene Pax6) είναι απαραίτητο για την έναρξη της ανάπτυξης του οφθαλμού η οποία ξεκινά με την εγκόλπωση των **οπτικών αυλάκων (optic groove)**. (Εικόνα 14)



Εικόνα 14: Εμβρυολογική ανάπτυξη του οφθαλμού

Κατά τη διάρκεια της 4^{ης} εβδομάδας κύησης, με τη σύγκλιση του νευρικού σωλήνα, οι οπτικές αύλακες μετατρέπονται σε **οπτικά κυστίδια (optic vesicles)** που εμφανίζονται ως εξογκώματα εκατέρωθεν του αναπτυσσόμενου πρόσθιου εγκεφάλου. Τα οπτικά κυστίδια έρχονται σε επαφή με το επιφανειακό εξώδερμα και το επάγουν προς διαφοροποίηση.

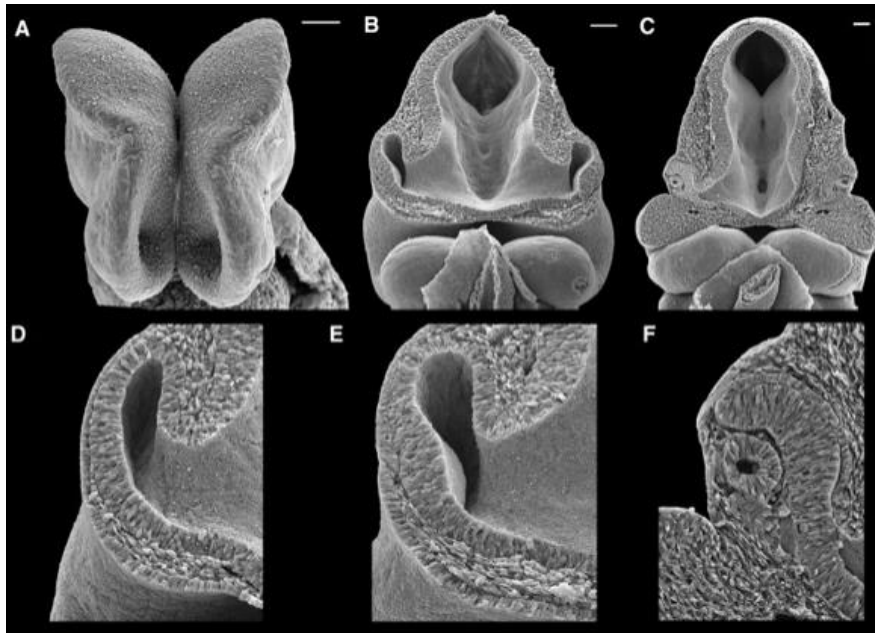
Εν συνεχεία, τα οπτικά κυστίδια αναδιπλώνονται και σχηματίζουν το οπτικό κύπελλο (**optic cup**) : η εσωτερική σιβάδα σχηματίζει το μελάγχρουν επιθήλιο και η εξωτερική σιβάδα τον νευροαμφιβληστροειδή. Καθώς το οπτικό κύπελλο εγκολπώνεται, δημιουργείται το πλακόδιο του φακού από μια πάχυνση του επιφανειακού εξωδέρματος και τελικά σχηματίζεται το κυστίδιο του φακού κατόπιν του διαχωρισμού του από το επιφανειακό εξώδερμα. (Εικόνες 15,16)



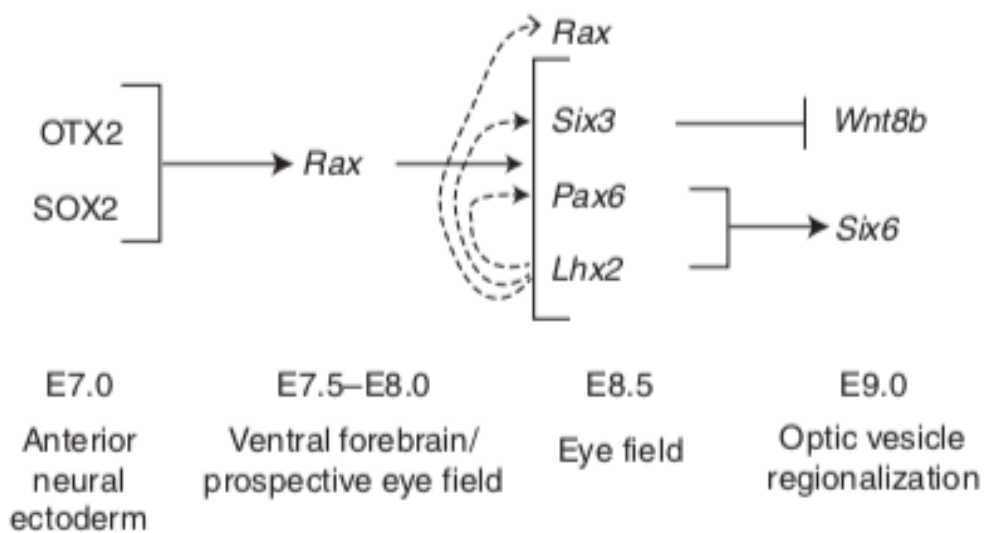
Εικόνα 15: Σχηματισμός αμφιβληστροειδούς και φακού

Κατά την εμβρυογένεση, τα κύτταρα της πρόσθιας νευρικής πλάκας που προορίζονται να διαφοροποιηθούν προς κύτταρα οφθαλμού εκφράζουν συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες (eye field transcription factors, EFTFs). Στα θηλαστικά οι παράγοντες αυτοί είναι 4 και περιλαμβάνουν τους Pax6, Rax, Six3 και Lhx2. Αποτελούν ένα ρυθμιστικό δίκτυο που είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του οφθαλμού.

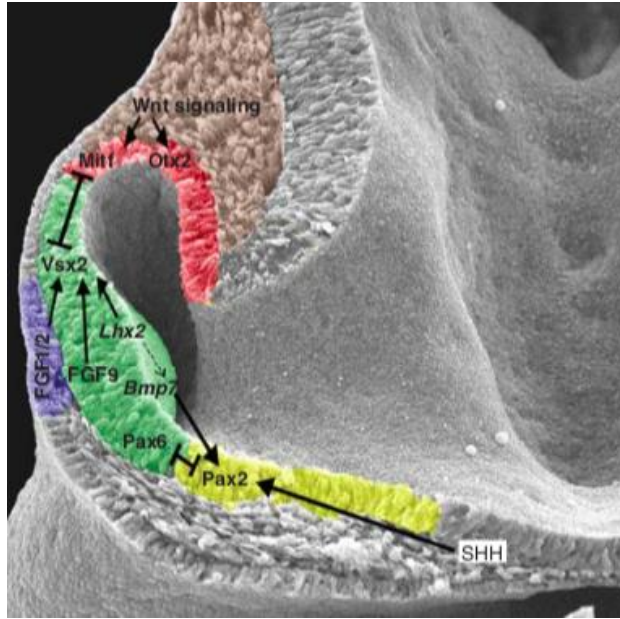
Οι μεταγραφικοί παράγοντες του νευροεξωδέρματος SOX2 και OTX2 ενεργοποιούν την έκφραση του Rax στο μελλοντικό πεδίο που θα σχηματιστεί ο οφθαλμός. Ο παράγοντας Rax είναι απαραίτητος για την επαγωγή της έκφρασης των EFTFs (Pax6, Rax, Six3 και Lhx2). Επίσης ο παράγοντας Lhx2 μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση των άλλων 3 παραγόντων. Η αλληλεπίδραση αυτών των παραγόντων μεταξύ τους καθορίζει και τους άξονες του οπτικού κυστιδίου. (Εικόνα 17)



Εικόνα 16: Ανάπτυξη του εγκεφάλου και των οφθαλμών σε έμβρυο ποντικού.
 (A, D) ημέρα 8.5 δημιουργία του οπτικού κυστιδίου
 (B, E) ημέρα 9.5 εγκόλπωση του οπτικού κυστιδίου και πάχυνση του πλακοδίου του φακού
 (C,F) δημιουργία του οπτικού κυπέλλου και του κυστιδίου του φακού



Εικόνα 17: Δίκτυο των μεταγραφικών παραγόντων που καθορίζουν την ανάπτυξη του οφθαλμού.



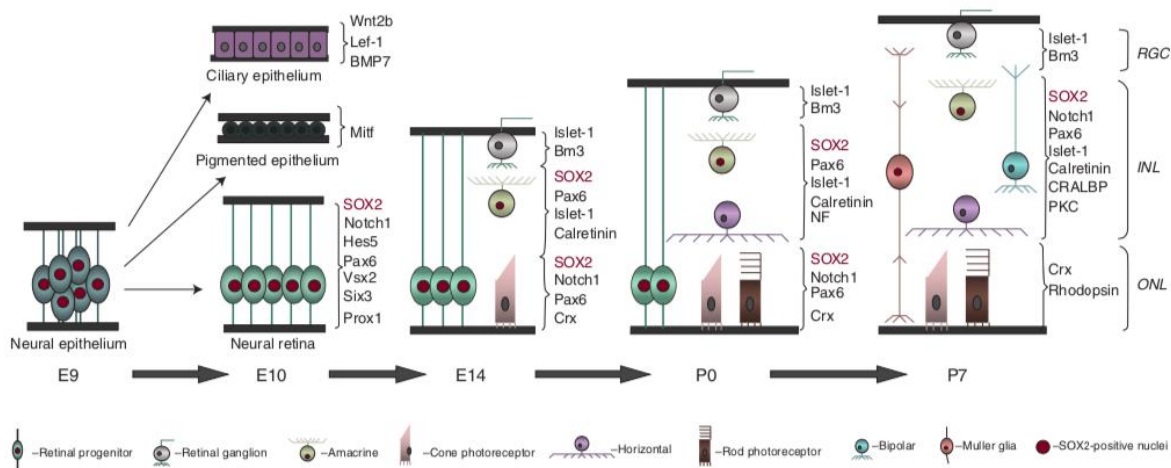
Εικόνα 18: Σηματοδοτικά μονοπάτια καθορίζουν τα όρια του οπτικού κυστιδίου. Το οπτικό κυτίδιο χωρίζεται τοπογραφικά στο μελλοντικό μελάγχρουν επιθήλιο (κόκκινο), νευροαμφιβληστροειδή (πράσινο) και στέλεχος του οπτικού νεύρου. Το πλακόδιο του φακού εμφανίζεται με μπλε χρώμα.

Το οπτικό κυτίδιο περιέχει βλαστικά κύτταρα αμφιβληστροειδούς (retinal stem cells, RSCs) που θα δώσουν γένεση σε όλα τα κύτταρα του οφθαλμού νευροεξωδερματικής προέλευσης (νευροαμφιβληστροειδής, μελάγχρουν επιθήλιο, στέλεχος οπτικού νεύρου). (Εικόνα 18)

Διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια εμπλέκονται στη διαμόρφωση του οπτικού κυστιδίου. Κάθε τμήμα του εκφράζει συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες που είναι απαραίτητοι για τη-διαφοροποίηση σε συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Ο μελλοντικός νευροαμφιβληστροειδής εκφράζει την ομοιοτική πρωτεΐνη Vsx2 (homeodomain protein Vsx2), το μελλοντικό μελάγχρουν τον μεταγραφικό παράγοντα Mitf (basic helix-loop-helix transcription factor Mitf) και ο οπτικός μίσχος την πρωτεΐνη Pax2 (paired domain protein Pax2). Ουσιαστικά τα retinal stem cells μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα νευροαμφιβληστροειδούς, μελαγχρόου επιθηλίου ή οπτικού μίσχου όταν λάβουν τον κατάλληλο συνδυασμό σημάτων.

Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες των κυττάρων ρυθμίζουν εξωκυττάρια σήματα ώστε να γίνει η λειτουργική διαφοροποίηση του οπτικού κυστιδίου. Τα εξωκυττάρια αυτά σήματα περιλαμβάνουν τον transforming growth factor- β (TGF- β), τον fibroblast growth factor (FGF), την οικογένεια Wnt και Sonic hedgehog (Shh). (Ludwig PE et al 2020, Heavner W and Pevny L 2012)

Εμβρυογένεση αμφιβληστροειδούς (retinogenesis)



Εικόνα 19: Στάδια νευρογένεσης του αμφιβληστροειδούς

Το νευροεπιθήλιο του οπτικού κυστιδίου διαφοροποιείται στο μελάγχρουν επιθήλιο, στο επιθήλιο του ακτινωτού σώματος και στους αμφιβληστροειδικούς προγόνους (retinal progenitor cells). Κατά την εμβρυική ζωή, σε ένα πρώιμο κύμα διαφοροποίησης, παράγονται πρώιμα γαγγλιακά κύτταρα, οριζόντιοι νευρώνες, κωνία και αμακρινή κύτταρα. Μετά τη γέννηση, τα προγονικά κύτταρα διαφοροποιούνται κυρίως σε ραβδία, δίπολα κύτταρα και νευρογλοιακούς νευρώνες (κύτταρα του Muller). Στον ενήλικο αμφιβληστροειδή, οι νευρώνες πλέον οργανώνονται σε 3 διακριτές στιβάδες: των γαγγλιακών κυττάρων (ganglion cell layer, GCL), την έσω πυρηνική (inner nuclear layer, INL) και την έξω πυρηνική (outer nuclear layer, ONL). (Εικόνα 19)

Οι αμφιβληστροειδικοί πρόγονοι νευρικών κυττάρων παραμένουν πλειοδύναμοι (multipotent) και σε διαδοχικά στάδια ανάπτυξης, με κάθε κυτταρική διαίρεση, τα προγονικά κύτταρα αυτά μπορούν να δώσουν διαφορετικούς απογόνους. Οι αμφιβληστροειδικοί πρόγονοι σε κάθε στάδιο αναπτύσσονται κατά προτίμηση σε έναν ή περισσότερους κυτταρικούς τύπους και έχουν περιορισμένο δυναμικό αυτοανανέωσης.

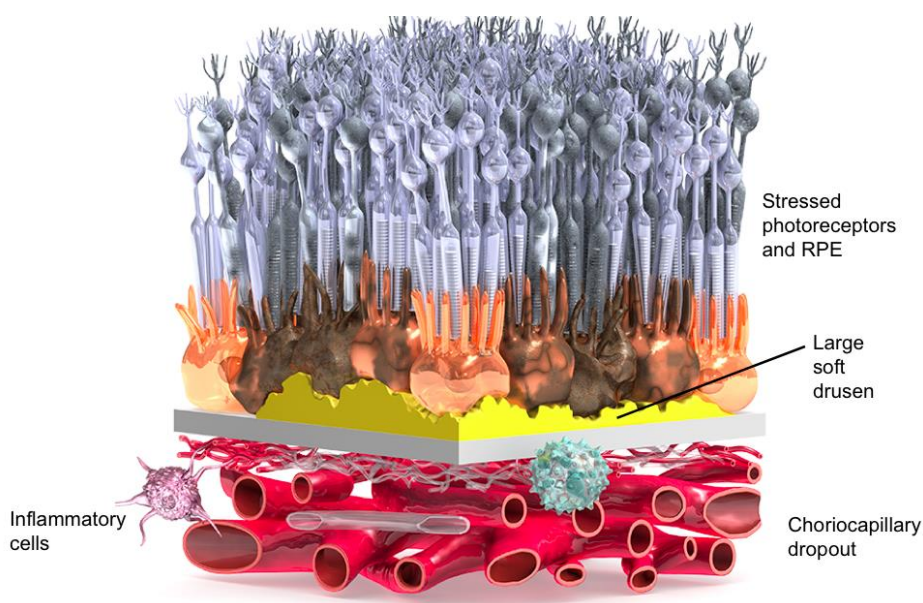
Στον αμφιβληστροειδή ενός ενήλικα ανθρώπου έχουν απομονωθεί κοντά στο ακτινωτό σώμα κάποια πιθανά προγονικά κύτταρα αλλά η ικανότητά τους να αυτοανανεωθούν και να διαφοροποιηθούν σε λειτουργικούς απογόνους παραμένει ασαφής. (Heavner W and Pevny L 2012)

2. Η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας του αμφιβληστροειδούς

Η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας του αμφιβληστροειδούς (age-related macular degeneration, AMD) είναι η κύρια αιτία μη αναστρέψιμης τύφλωσης σε άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών στο δυτικό κόσμο και η 3^η αιτία παγκοσμίως. Ο επιπολασμός της νόσου είναι 170 εκατομμύρια παγκοσμίως και αναμένεται να αυξηθεί στα 288 εκατομμύρια μέχρι το 2040 λόγω γήρανσης του πληθυσμού. Στις ΗΠΑ, ο επιπολασμός της AMD είναι παρόμοιος με όλων συνολικά των διηθητικών καρκίνων και υπερδιπλάσιος της νόσου του Alzheimer. Συνεπώς και η επιβάρυνση του συστήματος υγείας από τους ασθενείς με AMD είναι μεγάλη. (Pennington KL and DeAngelis MM 2016)

2.1 Παθοφυσιολογία της AMD

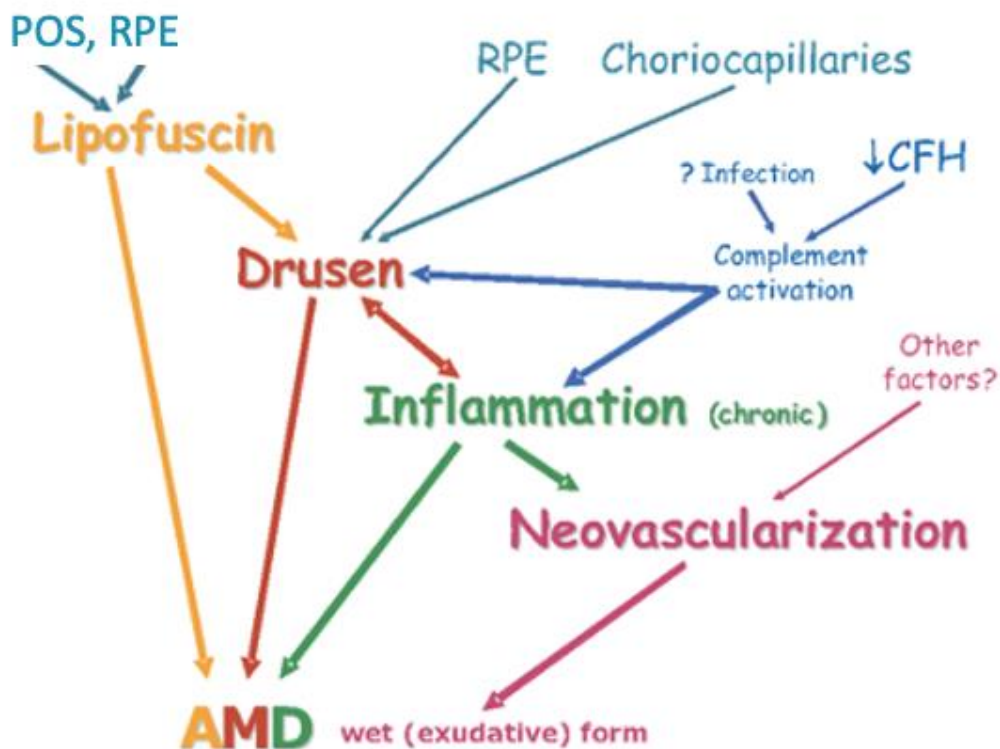
Η AMD είναι μια νευροεκφυλιστική νόσος που προσβάλλει την ωχρά κηλίδα η οποία εξυπηρετεί το κέντρο της ευκρινούς όρασης. Η παθοφυσιολογία της νόσου δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστή. Το βασικό χαρακτηριστικό της AMD είναι τα drusen (druse=πετρώδες οζίδιο) που αποτελούν εξωκυτταρικές εναποθέσεις κίτρινωπού υλικού μεταξύ του RPE και της μεμβράνης του Bruch. Το μέγεθος και ο αριθμός των drusen είναι ενδεικτικός της σοβαρότητας της νόσου και του κινδύνου εξέλιξης σε πιο προχωρημένα στάδια της νόσου. (Εικόνα 20)



Εικόνα 20: Τα drusen βρίσκονται ανάμεσα στο RPE και στη μεμβράνη του Bruch

Η σύσταση των drusen είναι κυρίως λιπιδική και πρωτεϊνική. Η σύσταση και η συσσώρευση των drusen μοιάζει με αυτή των αθηροσκληρωτικών πλακών. Τα λιπίδια που ανευρίσκονται στα drusen προέρχονται κυρίως από το RPE και τους φωτοϋποδοχείς ενώ ελάχιστα προέρχονται από την χοριοειδική αιματική κυκλοφορία. Αντιθέτως, οι πρωτεΐνες των drusen προέρχονται από το αίμα των χοριοτριχοειδών. Επιπλέον στα drusen ανευρίσκονται παράγοντες του συμπληρώματος (βιτρονεκτίνη, C3), αμυλοειδές, απολιποπρωτεΐνες, χοληστερόλη, ασβέστιο και μεταλλοπρωτεϊνάσες στρώματος (matrix metalloproteinase, MMPs).

Η συσσώρευση των drusen παρεμποδίζει τη σύνδεση του RPE με την αιματική κυκλοφορία του χοριοειδούς, οπότε προκαλείται υποξία στον αμφιβληστροειδή. Η υποξία με τη σειρά της επάγει την έκφραση του VEGFA (vascular endothelial growth factor A) και άλλων προαγγειογενετικών παραγόντων που προάγουν την ανάπτυξη νέων χοριοειδικών αγγείων (choroidal neovascularisation, CNV). Στην ανάπτυξη της AMD, σημαντικό ρόλο παίζουν ακόμη η τοπική χρόνια φλεγμονή, η ενεργοποίηση του συμπληρώματος, το οξειδωτικό στρες και η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. (Εικόνα 21) (Pennington KL and DeAngelis MM 2016)



Εικόνα 21: Σχηματική απεικόνιση της παθοφυσιολογίας της AMD

2.2 Κλινικές Μορφές της AMD

Η AMD κατηγοριοποιείται ανάλογα με τη βαρύτητά της σε πρώιμη, ενδιάμεση και προχωρημένη μορφή.

- Η πρώιμη και η ενδιάμεση μορφή αποτελούν το 90% των περιστατικών με AMD. Η πρώιμη μορφή της AMD είναι ήπια, ασυμπτωματική και χαρακτηρίζεται από την παρουσία drusen στην περιοχή της ωχράς κηλίδας σε άτομα ηλικίας άνω των 55 ετών. (Εικόνα 22)
- Στην ενδιάμεση μορφή τα drusen είναι περισσότερα σε μέγεθος και αριθμό ενώ μπορεί να συνυπάρχουν και αλλαγές στη χρωστική στην περιοχή της ωχράς. (Εικόνα 23) Συνήθως η ενδιάμεση μορφή είναι ασυμπτωματική. Ένα από τα πρώτα συμπτώματα της AMD είναι η καθυστερημένη προσαρμογή από φωτοπικές σε σκοτοπικές συνθήκες (delayed dark adaptation). Έτσι οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν δυσκολία όταν από ένα φωτεινό περιβάλλον μπουν σε ένα σκοτεινό (πχ είσοδος σε σκοτεινό τούνελ κατά την οδήγηση). Επίσης παρουσιάζουν δυσκολίες κατά την ανάγνωση και ευαισθησία σε έντονο φως.

Η πρώιμη και η ενδιάμεση μορφή αποτελούν 'ξηρές' μορφές της νόσου (dry AMD).



Εικόνα 22: Ήπια AMD. Παρουσία λίγων μικρών drusen στην περιοχή της ωχράς.



Εικόνα 23: Ενδιάμεση μορφή AMD. Τα drusen είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος και σε περισσότερα σε αριθμό. Παρατηρούνται επίσης και διαταραχές της χρωστικής στην περιοχή της ωχράς.

- Η προχωρημένη μορφή της AMD χωρίζεται σε 2 κατηγορίες: την ατροφική μορφή (γνωστή και ως γεωγραφική ατροφία) και την εξιδρωματική ή νεοαγγειακή μορφή (γνωστή και ως υγρή AMD). Και οι 2 μορφές οδηγούν σε σημαντική έκπτωση της όρασης.

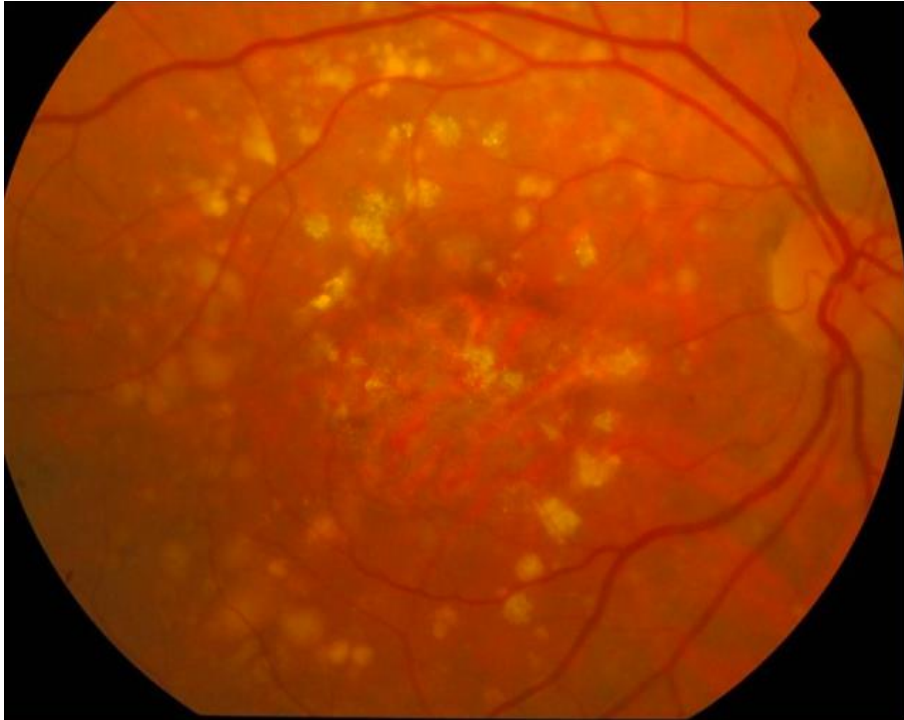
Η γεωγραφική ατροφία χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη ατροφία του αμφιβληστροειδούς (Εικόνα 24) και είναι η πιο προχωρημένη μορφή ξηράς AMD. Η απώλεια της όρασης στους ασθενείς με γεωγραφική ατροφία είναι σταδιακή.

Αντιθέτως, η νεοαγγειακή μορφή χαρακτηρίζεται από την παρουσία νεόπλαστων αγγείων. Τα νεοαγγεία που αναπτύσσονται σε αυτήν τη μορφή της νόσου συναντώνται συνήθως υπό το RPE, υπό τον αμφιβληστροειδή ή λιγότερο συχνά ενδοαμφιβληστροειδικά. Λόγω της αστάθειας του τοιχώματός τους, αιμορραγούν ή προκαλούν εξίδρωση πλάσματος υπαμφιβληστροειδικά (Εικόνα 25). Η αιμορραγία στην περιοχή της ωχράς προκαλεί ταχύτατα ουλοποίηση και απώλεια της όρασης μέσα σε περίπου 3 μήνες αν δεν αντιμετωπιστεί έγκαιρα. (Εικόνα 26) (Garcia-Layana A et al 2017)

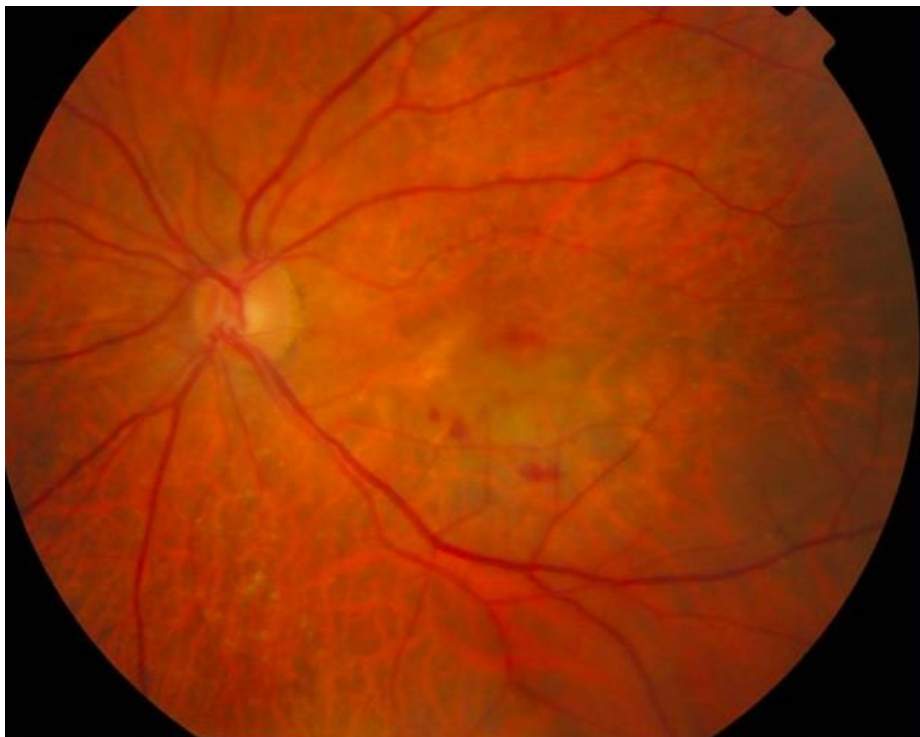
Οι ασθενείς με προχωρημένη AMD έχουν απώλεια της κεντρικής όρασης που επηρεάζει την ποιότητα ζωής τους και εμφανίζουν δυσκολίες κατά την ανάγνωση, την αναγνώριση προσώπων ή την οδήγηση. Στο οπτικό τους πεδίο εμφανίζεται ένα μεγάλο

κεντρικό σκότωμα και η όρασή τους είναι πιο δυσχερής κατά τις βραδινές ώρες. (Εικόνα 27)

30

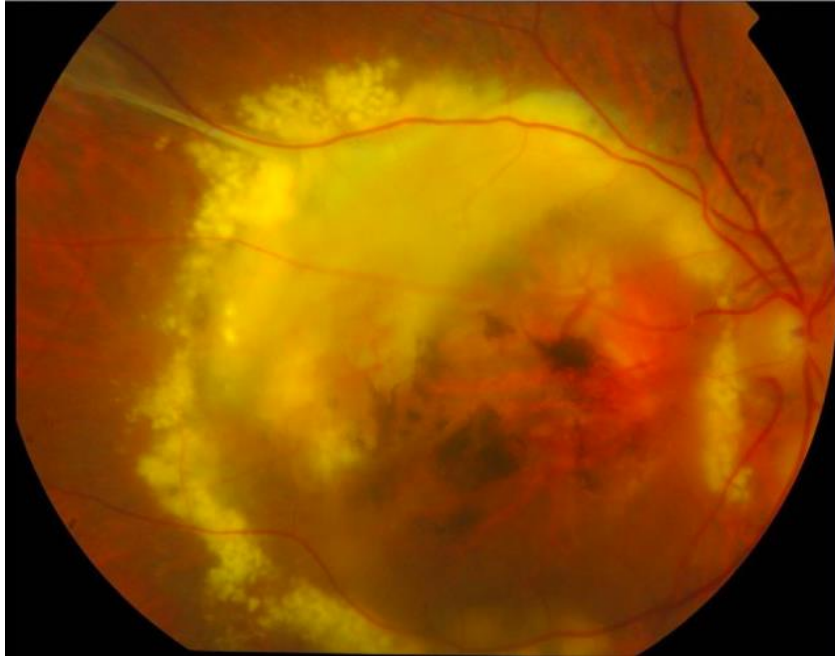


Εικόνα 24: Γεωγραφική ατροφία. Παρατηρούνται πολλά επασβεστωμένα drusen και σημαντικού βαθμού ατροφία στην περιοχή της ωχράς (διαφαίνονται τα υποκείμενα αγγεία του χοριοειδούς)

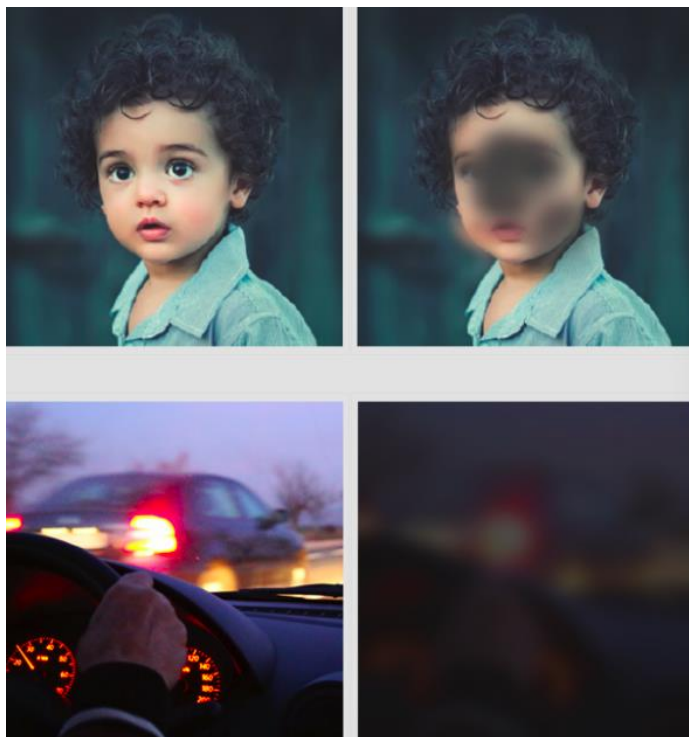


Εικόνα 25: Νεοαγγειακή μορφή AMD. Οι διάσπαρτες αιμορραγίες στον αμφιβληστροειδή υποδηλώνουν την ύπαρξη χorioειδικής νεοαγγείωσης.

31



Εικόνα 26: Δισκοειδής ουλή. Τελικού σταδίου νεοαγγειακή μορφή της AMD. Η προηγούμενη αιμορραγία υπό τον αμφιβληστροειδή έχει προκαλέσει ίνωση και ουλοποίηση.



Εικόνα 27: Το οπτικό πεδίο των ασθενών με προχωρημένη AMD. Κεντρική απώλεια όρασης και δυσχερής όραση σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού.

32

2.3 Η αγγειογένεση στην AMD



Εικόνα 28: Η διαδικασία της αγγειογένεσης στην AMD

Η αγγειογένεση είναι η διαδικασία με την οποία το σώμα δημιουργεί νέα αιμοφόρα αγγεία. Στους υγιείς ενήλικες, φυσιολογική αγγειογένεση συμβαίνει κατά την επούλωση τραυμάτων και κατά την κύηση. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις, η αγγειογένεση είναι παθολογική.

Η νεοαγγειακή AMD προκαλείται από μη φυσιολογική αγγειογένεση. Τα νεοαγγεία αναπτύσσονται κάτω από την ωχρά και διαταράσσουν την ανατομία και τη λειτουργία της ωχράς. Ειδικές πρωτεΐνες που ονομάζονται αυξητικοί παράγοντες (growth factors, GF) προκαλούν την ανάπτυξη των νεοαγγείων. Στον αμφιβληστροειδή ασθενών με υγρή AMD βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες ο αυξητικός παράγοντας ενδοθηλίου (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF).

Μεγάλη ποσότητα VEGF προκαλεί τη δημιουργία νεόπλαστων αγγείων που εκφύονται από τα αιμοφόρα αγγεία του χοριοειδούς που βρίσκονται κάτω από την ωχρά. Αυτά τα αγγεία που δημιουργούνται λόγω υπερέκκρισης VEGF, είναι εύθραυστα και εμφανίζουν διαρροή υγρού ή αίματος στον αμφιβληστροειδή. (Εικόνα 28)

Τα νεοαγγεία ακολούθως αναστομώνονται και σχηματίζουν αγκύλες. Περικύτταρα μεταναστεύουν στην περιοχή των νεοαγγείων, τυλίγονται γύρω από το τοίχωμά τους και το

σταθεροποιούν. Επίσης, ως απάντηση σημάτων που αποστέλλονται από τα νεοαγγεία, μεταναστεύουν και ενδοθηλιακοί πρόγονοι (endothelial progenitor cells).

2.4 Παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη AMD

- Ηλικία. Η ηλικία είναι ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου. Τα άτομα άνω των 60 ετών διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για την εμφάνιση της νόσου.
- Οικογενειακό ιστορικό. Οι άμεσοι συγγενείς νοσούντων έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να εκδηλώσουν τη νόσο.
- Η ύπαρξη AMD στον έναν οφθαλμό είναι παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου στον έτερο οφθαλμό.
- Το κάπνισμα αυξάνει τον κίνδυνο 2-3 φορές για την εκδήλωση της AMD. Ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου είναι ανάλογος με τον αριθμό των τσιγάρων ανά ημέρα.
- Φύλο. Οι γυναίκες είναι πιο πιθανό να νοσήσουν από AMD σε σχέση με τους άνδρες.
- Φυλή. Η νόσος είναι πιο συχνή στην λευκή φυλή και ιδιαίτερα στα άτομα με ανοικτόχρωμες ίριδες (πράσινες, μπλε).
- Παχυσαρκία
- Καρδιαγγειακή νόσος

2.5 Συμπτωματολογία της AMD

- Θολή όραση στο κεντρικό οπτικό πεδίο.
- Δυσκολία στην αναγνώριση προσώπων και στην ανάγνωση.
- Δυσκολία στην διάκριση μεταξύ των χρωμάτων.
- Ελάττωση της ευαισθησίας στη φωτεινή αντίθεση (contrast sensitivity).
- Δυσχερής προσαρμογή από συνθήκες έντονου σε χαμηλό φωτισμό.
- Απώλεια αντίληψης του βάθους.
- Αύξηση της ευαισθησίας σε έντονο φωτισμό.
- Ο ασθενής αντιλαμβάνεται στο οπτικό του πεδίο τις ευθείες γραμμές σαν κυματιστές ή διακεκομμένες (μεταμορφοψίες). (Εικόνα 29)



Εικόνα 29: Κεντρικό οπτικό πεδίο ατόμων με AMD

2.6 Διάγνωση της AMD

Η διάγνωση της AMD είναι κλινική. Εκτός από την κλινική εξέταση (βυθοσκόπηση), υπάρχουν και επιπρόσθετες παρακλινικές εξετάσεις που βοηθούν τόσο στη διάγνωση όσο και στην παρακολούθηση της νόσου. (Shao et al 2016)

- **Οπτική τομογραφία συνοχής (Optical Coherence Tomography, OCT)**

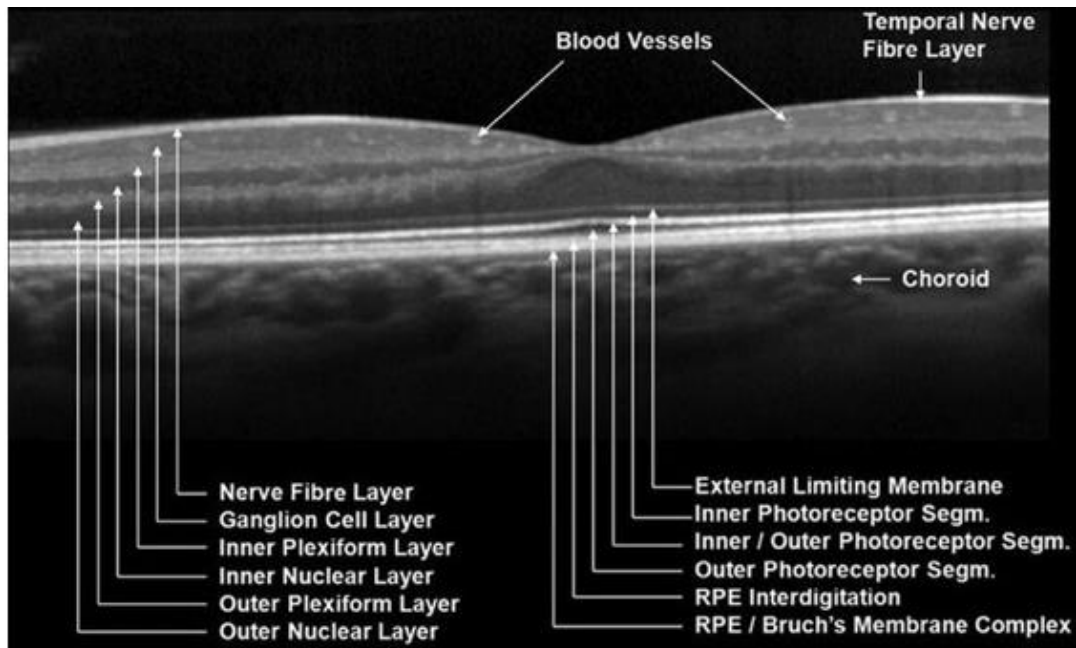
Πρόκειται για μία τεχνική μη επεμβατική και τελείως ανώδυνη, καθώς χρησιμοποιείται μια δέσμη φωτός η οποία προσπίπτει στον αμφιβληστροειδή και δίνει μια ψευδο-ανατομική εικόνα της ωχράς κηλίδας. Η εξέταση διαρκεί λίγα λεπτά και χρησιμοποιείται για τη διάγνωση και παρακολούθηση της AMD. (Εικόνα 30,31)

- **Φλουραγγειογραφία (Fluorescein Angiography, FA)**

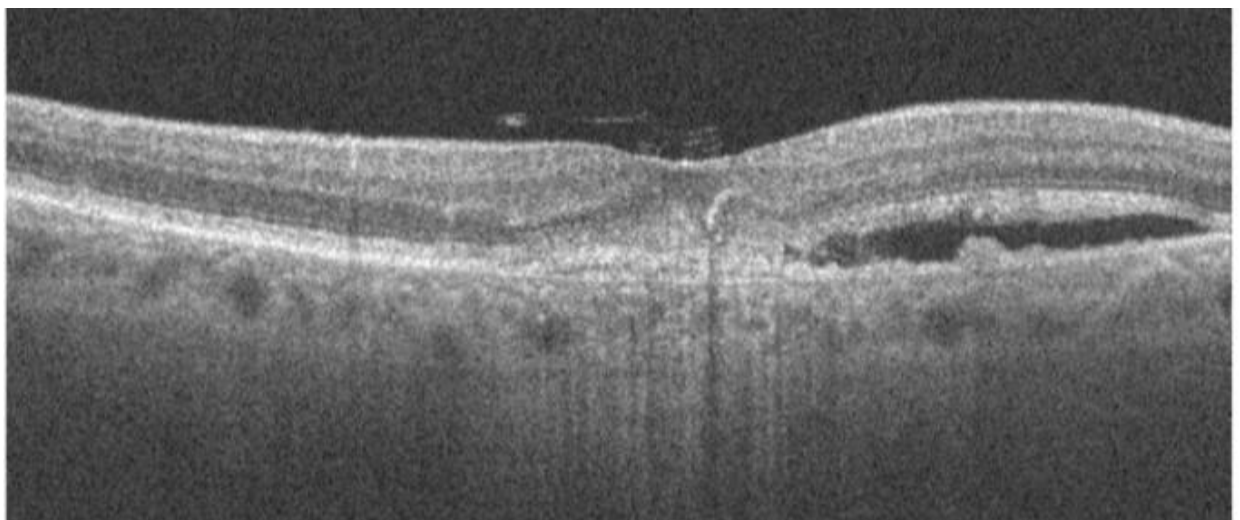
Η FA είναι μια διαγνωστική εξέταση κατά την οποία μια φθορίζουσα χρωστική, η φλουορεσεΐνη, εγχύεται ενδοφλεβίως στον ασθενή. Όταν η χρωστική φτάσει στον οφθαλμό, μια

ειδική κάμερα φωτογραφίζει τα αγγεία του αμφιβληστροειδούς. Η FA χρησιμοποιείται κυρίως για τη διάγνωση αλλά και για την παρακολούθηση της νόσου. (Εικόνα 32,33)

35

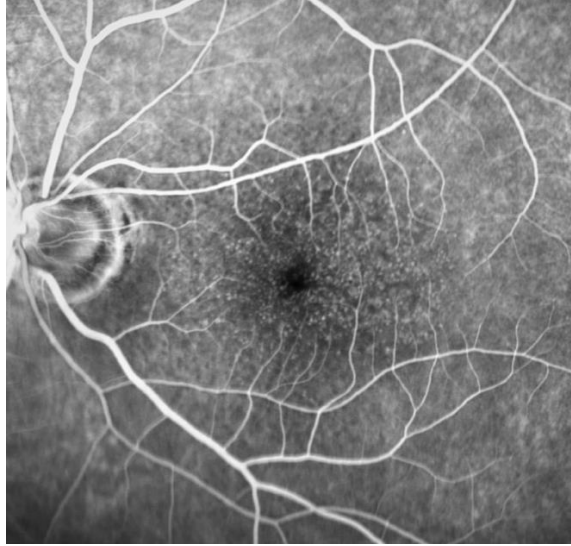


Εικόνα 30: Φυσιολογική απεικόνιση των στιβάδων του αμφιβληστροειδούς στην περιοχή της ωχράς κηλίδας με OCT



Εικόνα 31: Υγρή AMD. Η αρχιτεκτονική της ωχράς έχει διαταραχθεί. Παρατηρείται συλλογή υπαμφιβληστροειδικού υγρού. (Αρχείο Κ.Γοργόλη)

36



Εικόνα 32: Φλουραγγειογραφία ξηράς AMD. Παρουσία πολλών drusen στην περιοχή της ωχράς.



Εικόνα 33: Φλουραγγειογραφία υγράς AMD. Διαρροή χρωστικής από τα παθολογικά νεοαγγεία.

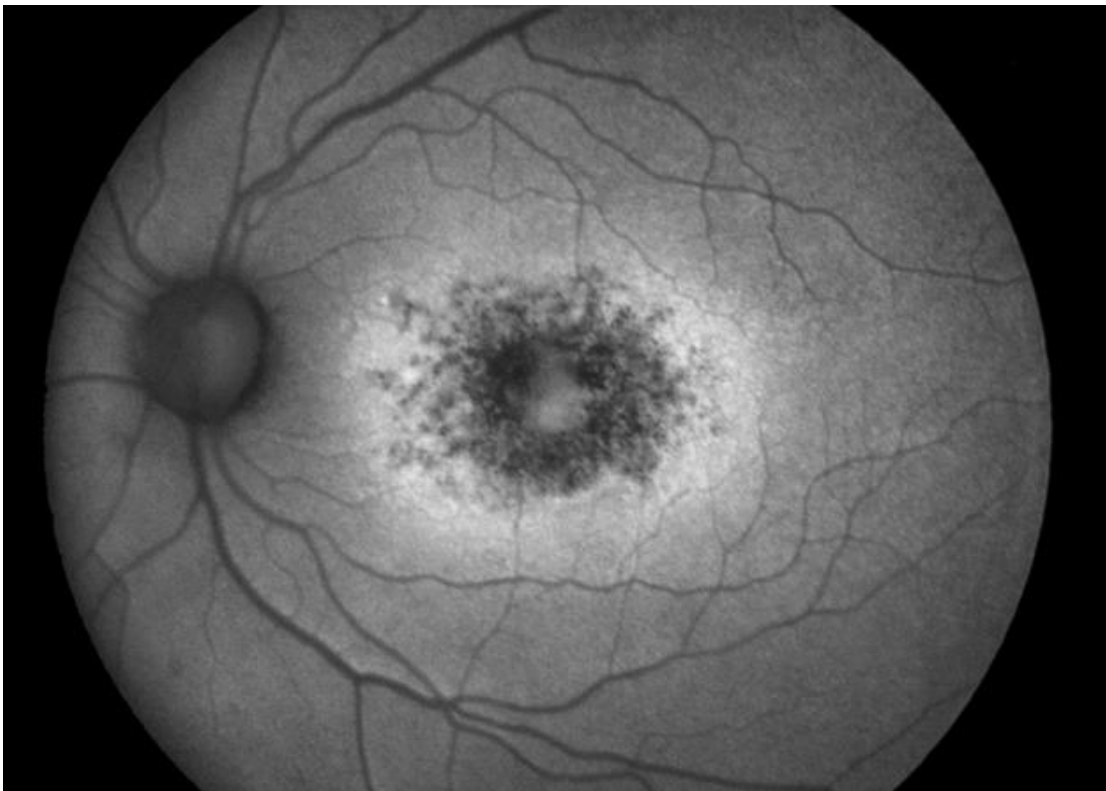
- **Κάμερα βυθού (Fundus camera) και Αυτοφθορισμός βυθού (Fundus Autofluorescence, FAF)**

Η κάμερα βυθού είναι ένα χαμηλής μεγεθυντικής ισχύος μικροσκόπιο με φωτογραφική μηχανή. Ειδικά φίλτρα τοποθετούνται σε αυτήν την κάμερα που ανιχνεύουν το φυσιολογικό φθορισμό (αυτοφθορισμό) της λιποφουσκίνης μέσα στα κύτταρα του μελαγχρόου επιθηλίου. Ο αυτοφθορισμός βυθού είναι μια μη παρεμβατική εξέταση που ανιχνεύει βλάβες στα κύτταρα του μελαγχρόου επιθηλίου. (Εικόνα 34)

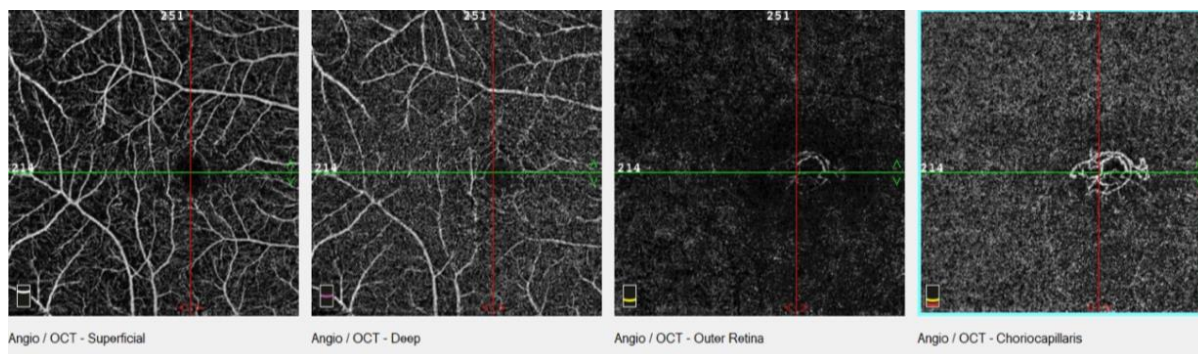
37

- **OCT Αγγειογραφία (Optical Coherence Tomography Angiography, OCTA)**

Η OCTA είναι μια νέα μη επεμβατική τεχνική απεικόνισης των αγγειακών δικτύων του αμφιβληστροειδούς και του χοριοειδούς. Πρόκειται για μια OCT με υψηλή συχνότητα σαρώσεων ανά δευτερόλεπτο που ανιχνεύει την κίνηση των ερυθρών αιμοσφαιρίων εντός των αγγείων και δημιουργεί εικόνες αγγειογραφίας μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα. Χρησιμοποιείται για τη διάγνωση και για την παρακολούθηση της AMD. (Εικόνα 35)



Εικόνα 34: Αυτοφθορισμός βυθού σε ασθενή με AMD. Οι σκοτεινές περιοχές αντιστοιχούν σε περιοχές βλάβης του RPE.



Εικόνα 35: OCTA ασθενούς με εξιδρωματική AMD. Παρουσία νεοαγγειακού θυσσάνου στη στιβάδα των χοριοτριχοειδών. (Αρχείο Κ.Γοργόλη)

2.7 Θεραπεία της AMD

Μέχρι το 2006, δεν υπήρχε αποτελεσματική θεραπεία για καμία μορφή της AMD. Για τη ξηρά AMD εξακολουθεί να μην υπάρχει αποτελεσματική θεραπεία μέχρι σήμερα. Η ιατρική παρέμβαση είναι καθαρά συμβουλευτική για μείωση των παραγόντων κινδύνου (διακοπή καπνίσματος, υιοθέτηση μεσογειακής διαίτας) και λήψη βιταμινούχων συμπληρωμάτων με καροτενοειδή (λουτεΐνη και ζεαξανθίνη) για προστασία της ωχράς.

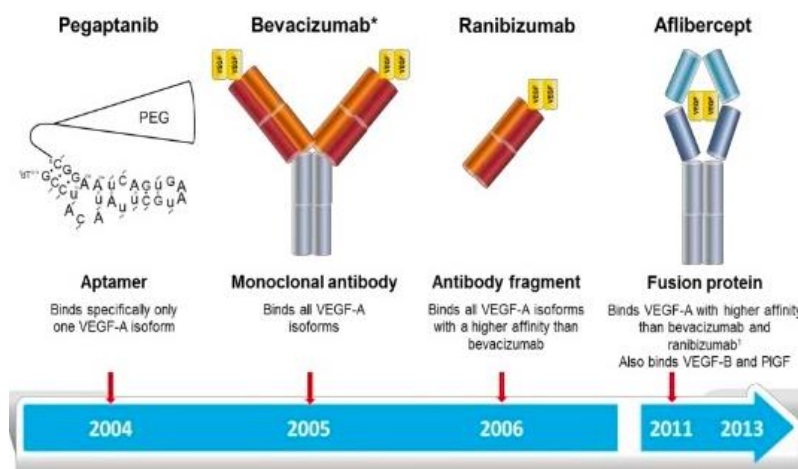
Σήμερα, για τη νεοαγγειακή AMD υπάρχουν καινούργιες θεραπείες με anti-VEGF παράγοντες. Τα φάρμακα που έχουν λάβει επίσημη έγκριση για τη χρήση τους σε νεοαγγειακή AMD είναι το ranibizumab (Lucentis, Novartis) και το aflibercept (Eylea, Bayer). Ένα τρίτο φάρμακο, το bevacizumab (Avastin, Roche), έχει χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση της νεοαγγειακής AMD αλλά αποτελεί μη-εγκεκριμένη ('off-label') θεραπεία. Το bevacizumab είχε λάβει έγκριση αρχικά για τη θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου (πχ. παχέος εντέρου).

Το bevacizumab είναι μονοκλωνικό αντίσωμα που συνδέεται με όλες τις ισομορφές του VEGF-A. Το ranibizumab είναι τμήμα αντισώματος (F_{ab}) που συνδέεται επίσης με όλες

τις ισομορφές του VEGF-A αλλά με μεγαλύτερη συγγένεια απ' ότι το bevacizumab. Τέλος, το aflibercept είναι μια πρωτεΐνη σύντηξης που συνδέεται με όλες τις ισομορφές VEGF-A με μεγαλύτερη συγγένεια από το bevacizumab και το ranibizumab, καθώς και με τον VEGF-B και τον PlGF (Placental Growth Factor). (Εικόνα 36)

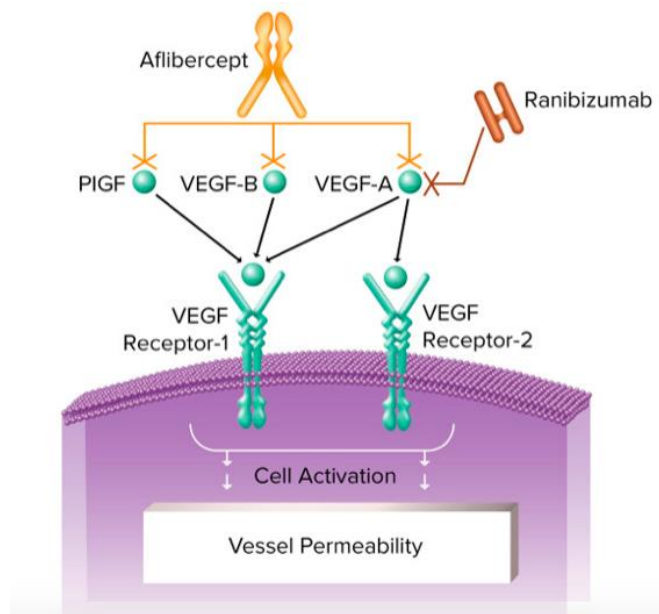
39

ANTI-VEGF DRUGS



Εικόνα 36: Δομή των anti-VEGF φαρμάκων

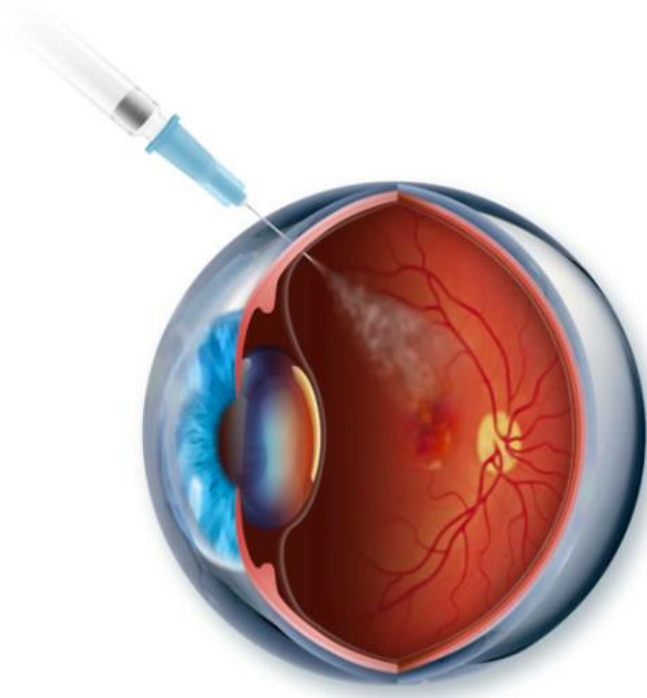
Τα συνθετικά αυτά αντισώματα συνδέονται με τον VEGF οπότε εμποδίζεται η σύνδεσή του στους κυτταρικούς υποδοχείς. Κατά συνέπεια αναστέλλεται η αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας και η παραγωγή νεόπλαστων αγγείων. (Εικόνα 37) (Shao J et al 2016)



Εικόνα 37: Μηχανισμός δράσης των anti-VEGF φαρμάκων

Τα anti-VEGF αντισώματα χορηγούνται ενδοϋαλοειδικά στον οφθαλμό από την περιοχή της pars plana. (Εικόνα 38) Οι ασθενείς με AMD λαμβάνουν αρχικά 1 έγχυση του φαρμάκου ανά μήνα για 3 μήνες και κατόπιν η θεραπεία επαναλαμβάνεται ανάλογα με την ενεργότητα της νόσου.

Η δράση των φαρμάκων στοχεύει στην υποστρόφη της νεοαγγειακής μεμβράνης και στη μείωση της αγγειακής διαπερατότητας. Κατά συνέπεια η όραση σταθεροποιείται και επιβραδύνεται ο ρυθμός εξέλιξης της νόσου. Παρ' όλα αυτά η βλάβη που προκαλείται στους φωτοϋποδοχείς και στα κύτταρα του RPE είναι μη αναστρέψιμη. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει θεραπεία που να στοχεύει στην αποκατάσταση των εκφυλισμένων αυτών κυττάρων.



Εικόνα 38: Μέθοδος χορήγησης anti-VEGF αντισωμάτων

3.Η χρήση βλαστικών κυττάρων για την ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας του αμφιβληστροειδούς.

3.1 Εισαγωγή

Το έτος 2020, ο αριθμός των ατόμων που νοσούν από AMD παγκοσμίως αγγίζει τα 196 εκατομμύρια ενώ υπολογίζεται ότι θα αυξηθεί στα 288 εκατομμύρια μέχρι το 2040. Η γήρανση του πληθυσμού οδηγεί σε μια δυσανάλογη αύξηση της νοσηρότητας από AMD καθώς και επιπρόσθετη επιβάρυνση στα συστήματα υγείας. Για την ξηρά AMD δεν υπάρχει καμία αποτελεσματική θεραπεία μέχρι σήμερα. Οι anti-VEGF παράγοντες χρησιμοποιούνται για τη

αντιμετώπιση της υγρής μορφής της AMD αλλά θα πρέπει να επαναλαμβάνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα.

Δεν υπάρχει καμία θεραπεία που να προλαμβάνει την εξέλιξη της νόσου σε πιο προχωρημένα στάδια. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι η αιτιολογία της νόσου είναι περίπλοκη (συμμετοχή γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων) καθώς και στη σύνθετη παθοφυσιολογία της.

Είναι πλέον επιτακτική ανάγκη η εύρεση νέων θεραπειών που θα στοχεύουν στην αιτιολογική θεραπεία της AMD και στη βελτίωση της κεντρικής όρασης των ασθενών.

Η χρήση των βλαστικών κυττάρων ανοίγει νέους ορίζοντες στην εύρεση καινοτόμων θεραπειών για την αντιμετώπιση των εκφυλιστικών παθήσεων του αμφιβληστροειδούς.

3.2 Η κυτταρική θεραπεία (cell therapy) της AMD- Μηχανισμοί δράσης

Μια ποικιλία κυτταρικών θεραπειών με διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους έχουν μελετηθεί για τη θεραπεία της AMD.

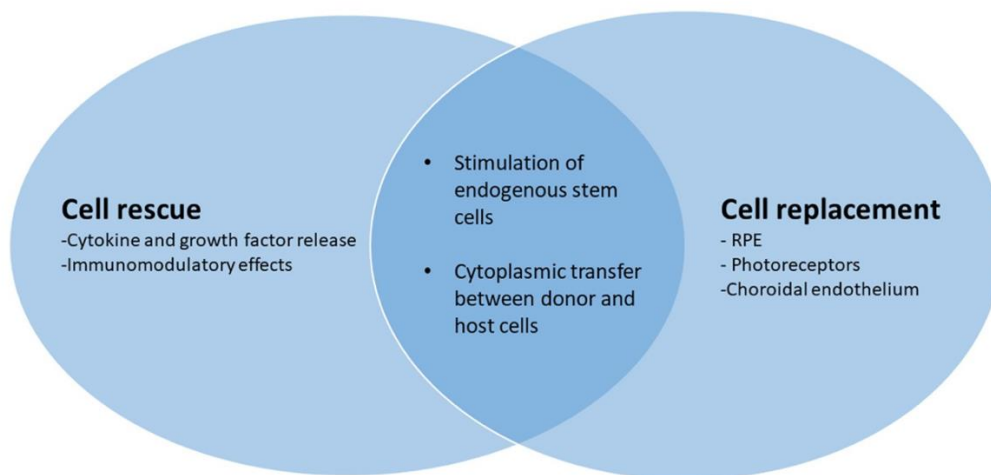
Η μεταμόσχευση 'νεαρών' κυττάρων στοχεύει στην αποκατάσταση και αντικατάσταση των γηρασμένων και εκφυλισμένων κυττάρων. Ακόμη και σε προχωρημένα στάδια της AMD, παρά την εκτεταμένη εκφύλιση των έξω στιβάδων του αμφιβληστροειδούς, ο έσω αμφιβληστροειδής με την περίπλοκη νευρική συνδεσμολογία του που καταλήγει στον εγκέφαλο παραμένει ανατομικά ακέραιος. Η αντικατάσταση λοιπόν των κυττάρων του έξω αμφιβληστροειδούς (**cell replacement therapy**) θα μπορούσε να αποκαταστήσει την όραση. Η AMD είναι κυρίως νόσος του συμπλόκου RPE/ μεμβράνης του Bruch/ χοριοτριχοειδών στα αρχικά στάδια. Σε ασθενείς με

42

πρόσφατη νεοαγγειακή/υγρά AMD που δεν εμφανίζουν βλάβη στους φωτοϋποδοχείς, η αντικατάσταση του μελαχρόου επιθηλίου μόνο μπορεί να είναι επαρκής. Αντίθετα, σε ασθενείς με ξηρά AMD ή προχωρημένη υγρά AMD υπάρχει ποικίλου βαθμού συνοδός ατροφία των φωτοϋποδοχέων και ίσως για τη θεραπεία της χρειαστεί αντικατάσταση και άλλων κυττάρων του αμφιβληστροειδούς. (Εικόνα 39)

Επίσης, οι κυτταρικές θεραπείες μπορούν να προστατεύουν τα κύτταρα του δέκτη με την παραγωγή κυττοκινών και νευροτροφικών παραγόντων (**παρακρινής δράση**). Η ανοσοτροποποιητική τους δράση μπορεί να αναστείλλει την νευροεκφυλιστική πορεία της νόσου. (Εικόνα 39) Η θεραπεία με μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (mesenchymal stem cells, MSCs) και με μεσεγχυματικά κύτταρα προερχόμενα από αίμα του ομφαλίου λώρου (umbilical

cord derived MSCs) έχει δοκιμαστεί στην AMD λόγω των ανοσοτροποποιητικών ιδιοτήτων των συγκεκριμένων κυττάρων.



Εικόνα 39: Πολλαπλοί και αλληλοεπικαλυπτόμενοι μηχανισμοί δράσης των κυτταρικών θεραπειών για την AMD

Ο μηχανισμός δράσης μπορεί επίσης να είναι **μικτός**. Σε πρόσφατες μελέτες παρατηρήθηκε ότι η μεταμόσχευση αρχέγονων φωτοϋποδοχέων μπορεί να αποκαταστήσει την κυτταρική και οπτική λειτουργία κυρίως με τη μεταφορά κυτταροπλασματικού υλικού στα κύτταρα του δέκτη παρά με την ενσωμάτωσή τους στον ιστό στόχο. Η πιθανή νευροπροστατευτική δράση των κυτταρικών θεραπειών μπορεί να αποτελεί την πιο σημαντική λειτουργία τους, διεγείροντας τους ενδογενείς επανορθωτικούς μηχανισμούς του αμφιβληστροειδούς. (Chichagova V et al 2018)

3.3 Ο οφθαλμός ως όργανο-στόχος για την εφαρμογή κυτταρικών θεραπειών

Η ανάπτυξη της αναγεννητικής ιατρικής είναι ταχύτατη και ο οφθαλμός είναι στην πρώτη γραμμή ανάπτυξης κυτταρικών θεραπειών διότι αποτελεί ιδανικό όργανο για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς τους. Ειδικά ο έξω αμφιβληστροειδής και η περιοχή της ωχράς έχουν μελετηθεί πολύ λόγω των εξής πλεονεκτημάτων:

- Η περιοχή της ωχράς κηλίδας είναι μικρή σε έκταση.
- Ο έξω αμφιβληστροειδής εμφανίζει ανοσολογική υπεροχή/ασυλία (immune privileged) λόγω του έξω αιματοαμφιβληστροειδικού φραγμού.
- Είναι πολύ εύκολη η κλινική εξέταση της περιοχής.

- Ο χώρος μεταξύ των φωτοϋποδοχέων και του μελαγχρόου επιθηλίου είναι χειρουργικά προσβάσιμος και διατάσιμος ώστε να ευνοεί την ένεση θεραπειών υπαμφιβληστροειδικά.
- Οι ανατομικές συνδέσεις μεταξύ των μεταμοσχευμένων κυττάρων και των κυττάρων του μελαγχρόου επιθηλίου και των φωτοϋποδοχέων είναι σχετικά απλές αν συγκριθούν με την πολυπλοκότητα άλλων νευρωνικών συνδέσεων του κεντρικού νευρικού συστήματος.
- Η ανατομική απεικόνιση του αμφιβληστροειδούς καθώς και η εκτίμηση της λειτουργίας του μπορούν να γίνουν με πολύ μεγάλη ακρίβεια.
- Ο αριθμός των κυττάρων που χρειάζονται για να βελτιώσουν την οπτική λειτουργία είναι μάλλον χαμηλός (περίπου 25,000 κύτταρα σε μοντέλα βοοειδών).

Οι ενδοϋαλοειδικές ενέσεις αποτελούν πλέον μέρος της καθημερινής κλινικής πράξης και κύτταρα που χορηγούνται με αυτόν τον τρόπο μπορούν να έχουν επίδραση στον έξω αμφιβληστροειδή μέσω παρακρινούς δράσης. (Chichagova V et al 2018)

3.4 Μεταμόσχευση κυττάρων μελαγχρόου επιθηλίου RPE

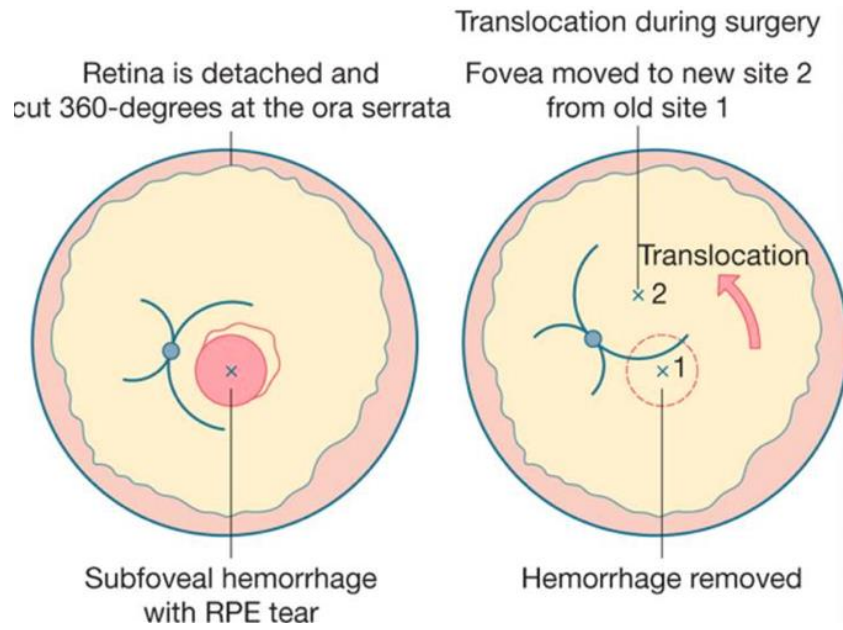
Το RPE χάνει την ικανότητά του να φαγοκυτταρώνει και να απομακρύνει τοξικά προϊόντα του μεταβολισμού των φωτοϋποδοχέων με την πάροδο της ηλικίας. Η έκπτωση της λειτουργικότητας του RPE είναι βασική για την ανάπτυξη AMD. In vivo, το RPE έχει πολύ περιορισμένες δυνατότητες αναγέννησης, συνεπώς η εκφύλιση αυτών των κυττάρων οδηγεί σε θάνατο των φωτοϋποδοχέων και μη αναστρέψιμη τύφλωση.

44

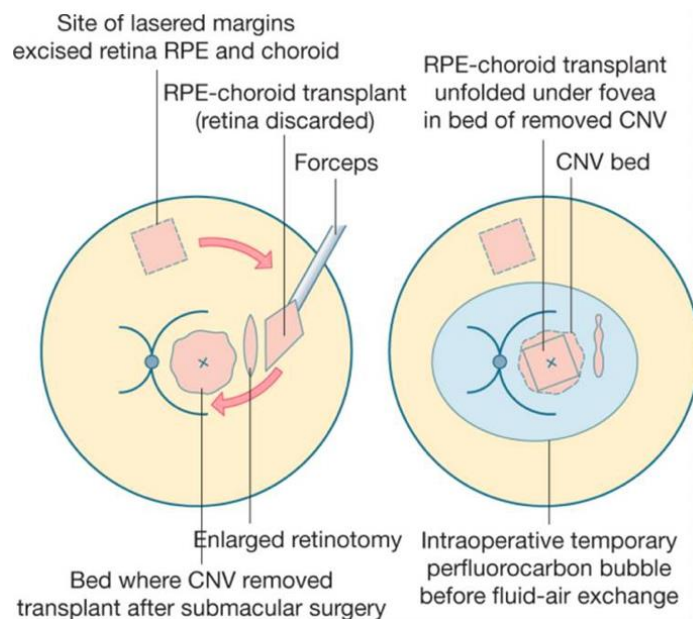
Η μεταμόσχευση του RPE μπορεί να έχει δυνητικά 2 λειτουργίες στην AMD: αποκατάσταση της λειτουργίας του RPE και τροφική στήριξη σε εκφυλισμένα κύτταρα. Στις πρώτες μελέτες που έγιναν σε πειραματόζωα, η μεταμόσχευση κυττάρων RPE φάνηκε να έχει προστατευτική επίδραση στην εκφύλιση των φωτοϋποδοχέων και μπορεί να πυροδοτήσει την αναγέννηση του ενδοθηλίου των χοριοτριχοειδών.

Σε ασθενείς με προχωρημένη AMD, έχουν διεξαχθεί μελέτες αυτόλογης μεταμόσχευσης RPE όπου είτε γίνεται μεταφορά του νευροαμφιβληστροειδούς σε γειτονική περιοχή υγιούς RPE (Εικόνα 40), είτε μεταφέρονται στην περιοχή της ωχράς αυτόλογα μοσχεύματα RPE από τον

περιφερικό αμφιβληστροειδή (Εικόνα 41). Οι μελέτες αυτές κατέδειξαν βελτίωση της όρασης σε περιστατικά που η βλάβη των φωτοϋποδοχέων δεν ήταν μόνιμη.



Εικόνα 40: Μετάθεση νευροαμφιβληστροειδούς σε γειτονική περιοχή με υγιές RPE



Εικόνα 41: Αυτόλογη μεταμόσχευση τμημάτων RPE από τον περιφερικό αμφιβληστροειδή

3.5 Μεταμόσχευση φωτοϋποδοχέων

Σε περιπτώσεις προχωρημένης AMD όπου έχει επέλθει μη αναστρέψιμη βλάβη των φωτοϋποδοχέων απαιτείται συνδυασμένη μεταμόσχευση φωτοϋποδοχέων και κυττάρων RPE. Ακόμα και στα πιο προχωρημένα στάδια της νόσου, παρά την εκτεταμένη ατροφία των έξω στιβάδων του αμφιβληστροειδούς, οι έσω στιβάδες επιβιώνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την εκφύλιση των φωτοϋποδοχέων και αναδιαμορφώνονται οι συνάψεις τους (remodelling).

Σε περίπτωση μεταμόσχευσης, οι νέοι φωτοϋποδοχείς θα πρέπει να σχηματίσουν μόνο μια σύναψη με τα δίπολα κύτταρα. Η πλαστικότητα που υπάρχει στα νευρωνικά κυκλώματα επιτρέπει την αναίρεση της αναδιαμόρφωσης που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της εκφύλισης και τη δημιουργία νέων συνάψεων.

Έχουν προταθεί 2 τρόποι μεταμόσχευσης φωτοϋποδοχέων: ως εναιώρημα κυττάρων (cell suspension) ή ως φύλλα αμφιβληστροειδούς (retinal sheets).

Οι μεταμιτωτικοί πρόδρομοι φωτοϋποδοχείς (metamitotic photoreceptor precursors) είναι ο ιδανικότερος κυτταρικός τύπος για μεταμόσχευση σε σχέση με τα αμφιβληστροειδικά προγονικά κύτταρα (retinal progenitor cells) ή τους διαφοροποιημένους φωτοϋποδοχείς ενηλίκου. Τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα, να ωριμάζουν και να βελτιώνουν την οπτική λειτουργία σε ζωικά μοντέλα. Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται κυρίως στη μεταφορά κυτταροπλασματικού υλικού μεταξύ των κυττάρων δότη και δέκτη παρά σε αντικατάσταση των φωτοϋποδοχέων.

Σε αρκετούς ασθενείς έχουν μεταμοσχευθεί εμβρυικοί αμφιβληστροειδείς (foetal retinas) ως μικροσυσσωματώματα (microaggregates) ή φύλλα ιστού (sheets). Μια τέτοια μελέτη φάσης II που διεξήχθη, περιελάμβανε 10 ασθενείς (6 με μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια και 4 με AMD). Η όραση βελτιώθηκε σε ορισμένους ασθενείς και η βελτίωση αυτή παρατηρήθηκε 6 μήνες μετά το χειρουργείο, διάστημα που αντιστοιχεί στο χρόνο που χρειάζονται τα εμβρυικά κύτταρα να διαφοροποιηθούν σε ώριμους και λειτουργικούς φωτοϋποδοχείς. Η αποτελεσματικότητα της μεταμόσχευσης έγκειται στην αντικατάσταση κυττάρων παρά σε μια βραχύβια τροφική επίδραση.

Έχει παρατηρηθεί ότι η μεταμόσχευση εμβρυικών φύλλων αμφιβληστροειδούς στον άνθρωπο έχει καλύτερα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με τα μικροσυσσωματώματα ή το εναιώρημα κυττάρων. Βέβαια προκύπτουν μείζονα ηθικά ζητήματα καθώς η ιδανική ηλικία για τη λήψη εμβρυικού ιστού είναι το 2^ο τρίμηνο της κύησης. (Chichagova V et al 2018)

3.6 Πηγές κυττάρων για μεταμόσχευση

Μια μεγάλη ποικιλία κυττάρων έχουν χρησιμοποιηθεί για μεταμόσχευση στην AMD. Τα κύτταρα αυτά μπορεί να προέρχονται από:

- βλαστικά κύτταρα ενήλικων ιστών (adult tissue-derived stem cells)
- εμβρυικά προγονικά κύτταρα (foetal derived progenitor cells)
- πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (pluripotent stem cell derived cells).

Στον Πίνακα 2 συνοψίζονται τα διαφορετικά είδη κυττάρων που έχουν χρησιμοποιηθεί. Από αυτά, τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (pluripotent stem cells - PSCs) θεωρούνται σήμερα η κύρια πηγή βλαστικών κυττάρων τόσο για την αναγέννηση των φωτοϋποδοχέων όσο και την αναγέννηση του μελαγχρόου επιθηλίου.

Table 1 Cell sources for transplantation

Category	Type	Current or previous human trials in AMD?
Autologous ocular tissue	RPE patch +/- Bruch's membrane and choroid	Yes [26, 27, 85, 86]
	Peripheral RPE as suspension	Yes [87]
	Iris pigment epithelium	Yes as cell suspension and microaggregates [88–90]
Foetal	Neuroretina	Yes as cells suspension and microaggregates [58, 59]
	RPE sheet	Yes [91, 92]
	Combined RPE and retinal sheet	Yes [61, 93]
	Retinal progenitor cells	Yes—See Table 2
Adult stem cells	RPE	To date only as an allograft of unsorted adult RPE [94, 95]
	Muller cells	Not as yet
	Ciliary margin zone stem cells	Not as yet
Mesenchymal stem cells		Yes—intravitreal and subretinal Table 2
Adipose-derived cells		Yes—Intravitreal (Table 2).
Umbilical tissue cells		Yes—cell suspension subretinally delivered via transchoroidal route (Table 2).
Embryonic stem cells	Differentiated to all retinal cell types	Yes as RPE cell suspension and sheet (Table 2).
Induced pluripotent stem cells	Differentiated to all retinal cell types	Yes as cell sheet Table 2

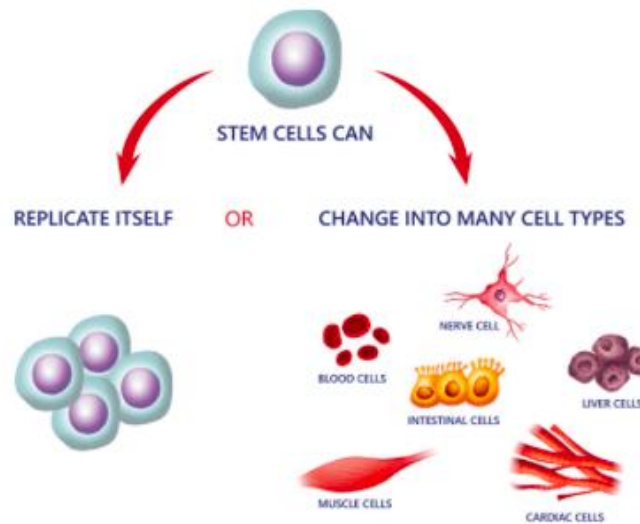
Πίνακας 2: Πηγές κυττάρων για μεταμόσχευση σε AMD (Chichagova V. et al)

3.7 Πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (Pluripotent stem cells, PSCs)

Οι δύο κύριοι τύποι πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων είναι τα ανθρώπινα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (**human embryonic stem cells, hESCs**) και τα ανθρώπινα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (**human induced pluripotent stem cells, hiPSCs**). Πρόκειται για κύτταρα μη διαφοροποιημένα που έχουν την ικανότητα αυτοανανέωσης και μπορούν να διαφοροποιηθούν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. (Εικόνα 42)

Το 1998, απομονώθηκε η πρώτη κυτταρική σειρά με **hESCs** από κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας (inner cell mass) βλαστοκύστης ανθρώπινου εμβρύου που προήλθε από εξωσωματική γονιμοποίηση. Οι σειρές των hESCs εμφάνισαν απεριόριστο δυναμικό αυτοανανέωσης in vitro και διατηρούσαν τη δυνατότητα να σχηματίζουν παράγωγα και των 3 βλαστικών δερμάτων (ενδοδέρματος, μεσοδέρματος και εξωδέρματος). Η χρήση τους στην έρευνα προκάλεσε ηθικά διλήμματα και γι' αυτό σε μερικές χώρες έχει απαγορευτεί. Οι διαφοροποιημένοι απόγονοι των

hESCs εκφράζουν HLA αντιγόνα (human leukocyte antigens) που μπορούν να οδηγήσουν σε απόρριψη μοσχεύματος κατόπιν μεταμόσχευσης. Το εμπόδιο αυτό θα μπορούσε να ξεπεραστεί με τη δημιουργία κυτταρικών τραπεζών HLA-typed hESCs από τις οποίες το κατάλληλο μόσχευμα θα επιλέγεται για τον κάθε δέκτη. (Thompson JA et al 1998)



Εικόνα 42: Ιδιότητες βλαστικών κυττάρων, αυτοανανέωση και διαφοροποίηση σε όλους τους κυτταρικούς τύπους.

Το 2006, ο Yamanaka και οι συνεργάτες του απομόνωσαν 4 μεταγραφικούς παράγοντες κλειδιά που όταν εκφραστούν εξωγενώς σε ενήλικα σωματικά κύτταρα επάγεται η μετατροπή τους σε πολυδύναμα μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται επαναπρογραμματισμός (reprogramming). Ανθρώπινα ενήλικα σωματικά κύτταρα, τυπικά ινοβλάστες, μπορούν να επαναπρογραμματιστούν σε πολυδύναμα κύτταρα με την μεταφορά μέσω ρετροϊού 4 γονιδίων πολυδυναμίας που κωδικοποιούν τους εξής μεταγραφικούς παράγοντες: Oct3/4, Klf4, Sox2 και c-Myc. Τα 'τεχνητά' πολυδύναμα κύτταρα τα οποία δημιουργήθηκαν τα ονόμασαν επαγόμενα (**human induced pluripotent stem cells - hiPSCs**) και εμφανίζουν κοινές ιδιότητες με τα hESCs ως προς την ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης σε κυτταρικούς τύπους και των 3 βλαστικών δερμάτων. (Takahashi K et al 2007, Yu J et al 2007)

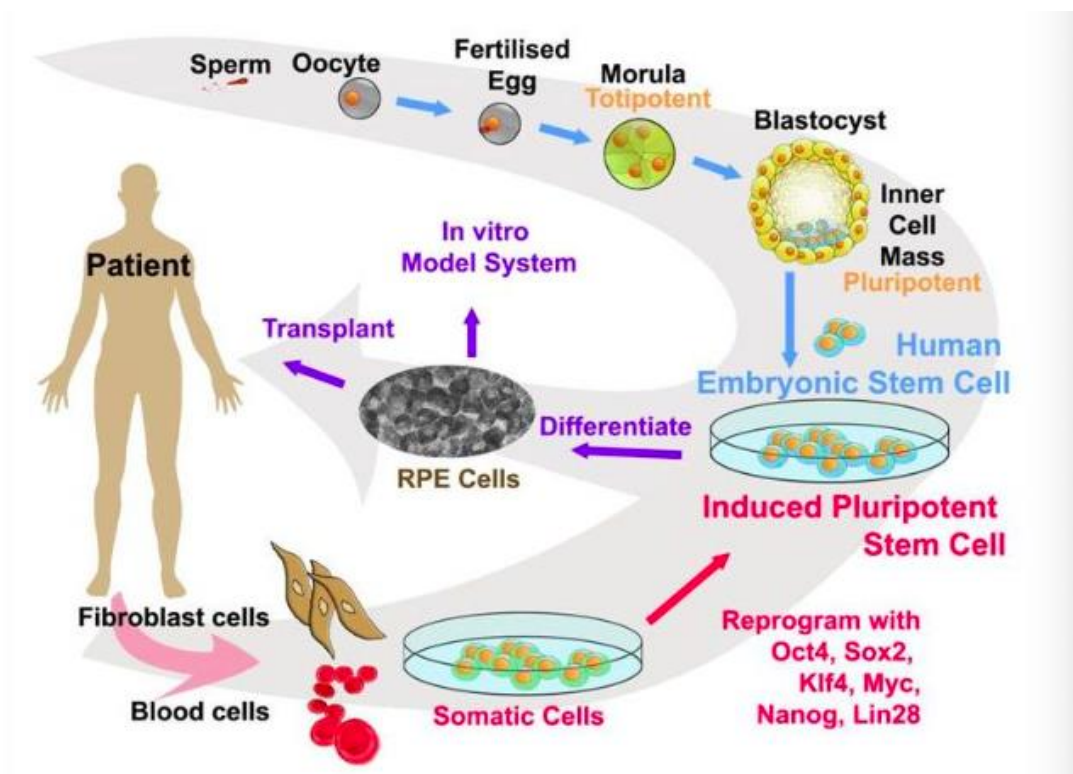
Η χρήση κυττάρων ενηλίκου επέτρεψε να ξεπεραστούν οι ηθικοί περιορισμοί που σχετίζονται με τη χρήση κυττάρων ανθρώπινων εμβρύων. Πέραν του γεγονότος ότι αποτελούν επιπλέον πηγή κυττάρων προς μεταμόσχευση, τα hiPSCs παρέχουν τη δυνατότητα για in vitro μοντελοποίηση

των νόσων και μελέτη της παθοφυσιολογίας ενός νοσήματος καθώς και εφαρμογών φαρμακοθεραπειών. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην περίπτωση του αμφιβληστροειδούς που τα κύτταρα του ασθενούς (φωτοϋποδοχείς, μελάγχρουν επιθήλιο) μπορούν να μελετηθούν μόνο κατόπιν επεμβατικής βιοψίας ή μετά θάνατον.

Βέβαια, η χρήση αυτόλογων κυττάρων ενέχει τον κίνδυνο τα κύτταρα αυτά να περιέχουν την ίδια μετάλλαξη που προκάλεσε τη νόσο. Αυτό δε φαίνεται να αποτελεί πρόβλημα για την AMD όπου η έναρξη της νόσου είναι όψιμη, συνήθως μετά τα 65 έτη. Ακόμη και γι' αυτό, η επεξεργασία των γονιδίων (gene editing) μπορεί να βελτιώσει την ενσωμάτωση των μεταμοσχευμένων κυττάρων και να μειώσει τις υποτροπές της νόσου στο μόσχευμα. Σε ασθενή με γνωστή γονιδιακή μετάλλαξη πραγματοποιείται γονιδιακή θεραπεία (gene therapy) με ιικούς φορείς (viral vectors) που διαμολύνουν φωτοϋποδοχείς ή κύτταρα του μελαγχρού επιθηλίου με το φυσιολογικό αντίγραφο του γονιδίου. Δεδομένου ότι τα κύτταρα αυτά είναι ώριμα και μη διαιρούμενα, η διαμόλυνση χρειάζεται να γίνει εφάπαξ. Οι νέες τεχνολογίες γονιδιακής επεξεργασίας όπως η CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/CAS9 RNA guided nucleases), αφαιρούν το μεταλλαγμένο τμήμα του γονιδίου και ταυτοχρόνως εισάγουν το διορθωμένο αντίγραφο, το οποίο ενσωματώνεται με ομόλογο ανασυνδυασμό.

Η χρήση των PSCs εγκυμονεί επίσης τον κίνδυνο δημιουργίας όγκων. Η μεταμόσχευση αδιαφοροποίητων πολυδύναμων κυττάρων που μπορεί να υπάρχουν σε μια διαφοροποιούμενη κυτταρική καλλιέργεια, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία τερατώματος. Ο κίνδυνος ανάπτυξης τερατώματος μπορεί να μειωθεί με την ανίχνευση δεικτών (TRA-1-60 και SSEA1) που ανιχνεύουν τα εναπομείναντα πολυδύναμα κύτταρα μέσα σε μια κυτταροκαλλιέργεια.

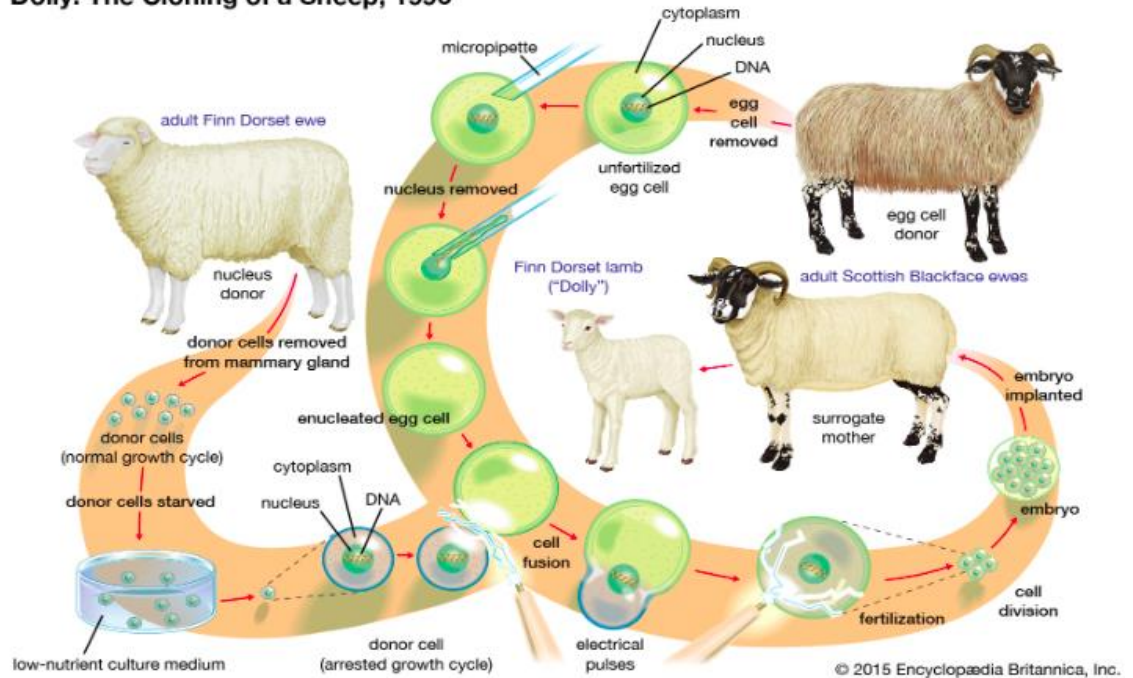
Τα hiPSCs είναι συγκρίσιμα με τα hESCs από άποψη μορφολογίας, κυτταρικής ανάπτυξης, επιφανειακών δεικτών, γονιδιακής έκφρασης, in vitro διαφοροποίησης και δημιουργίας τερατώματος. Η δυνατότητα δημιουργίας αυτόλογων κυτταρικών σειρών από επαναπρογραμματισμένα σωματικά κύτταρα του ασθενούς, καθιστά τα hiPSCs πολύ ελκυστική επιλογή για κλινικές εφαρμογές. Οι 2 αυτές κατηγορίες βλαστικών κυττάρων (hESCs και hiPSCs) έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή κυττάρων μελαγχρού επιθηλίου (RPE) και τη θεραπεία εκφυλιστικών νοσημάτων του οφθαλμού όπως η AMD. (Εικόνα 43)



Εικόνα 43: Παραγωγή κυττάρων RPE από hESCs και hiPSCs

Ένας τρίτος τύπος αυτόλογων PSCs μπορούν να παραχθούν με κλωνοποίηση. Με αυτήν την τεχνική, ο πυρήνας ενός ενήλικου σωματικού κυττάρου δότη εισάγεται σε ωάριο από το οποίο έχει αφαιρεθεί ο πυρήνας. Παράγεται λοιπόν ένα σχεδόν όμοιο γενετικά κύτταρο με αυτό του ενήλικου δότη πυρήνα, το οποίο θα παράγει ESCs και τελικώς έναν οργανισμό όμοιο με τον δότη όπως στην περίπτωση του προβάτου Dolly. (Εικόνα 44) Τα ESCs που δημιουργούνται με κλωνοποίηση είναι πιο δύσκολο να παραχθούν σε σχέση με τα iPSCs. Παρόλα αυτά, με την τεχνική αυτή δίνεται η δυνατότητα να αντικατασταθούν τα γηρασμένα ή άρρωστα μιτοχόνδρια του δότη οπότε μπορεί να αποτελέσει μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική προσέγγιση στο μέλλον.

Dolly: The Cloning of a Sheep, 1996



Εικόνα 44: Τεχνική της κλωνοποίησης

3.8 Διαφοροποίηση PSCs προς κύτταρα RPE και φωτοϋποδοχείς

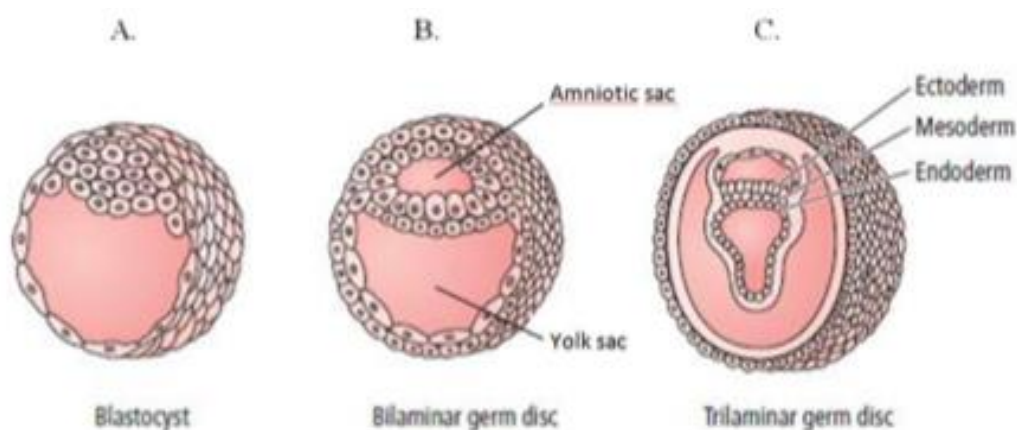
Η έσω κυτταρική μάζα (εμβρυοβλάστη) της βλαστοκύστης από την οποία προέρχονται όλοι οι εμβρυϊκοί ιστοί σχηματίζει την επιβλάστη και την υποβλάστη. Η επιβλάστη με τη σειρά της δίνει γένεση στα 3 βλαστικά δέρματα του εμβρύου (ενδόδερμα, μεσόδερμα και εξώδερμα). (Εικόνα 45) Κατόπιν το εξώδερμα διαφοροποιείται περαιτέρω σε νευροεξώδερμα και τελικώς σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του αμφιβληστροειδή.

Σε κυτταρικό επίπεδο, τα πολυδύναμα κύτταρα διαφοροποιούνται κατά στάδια σε νευρικούς και κατόπιν σε αμφιβληστροειδικούς πρόγονους πριν διαφοροποιηθούν τελικά είτε σε κύτταρα RPE είτε σε κύτταρα νευροαμφιβληστροειδούς. Όλα τα κύτταρα αυτά μπορούν να ανιχνευθούν με ειδικούς δείκτες ανοσοφθορισμού. Τα κύτταρα που θα διαφοροποιηθούν τελικά σε κύτταρα RPE παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση του δείκτη MITF ενώ τα κύτταρα του νευροαμφιβληστροειδούς εκφράζουν τον δείκτη CHX10 και ακολούθως την cone-rod

homeobox protein (Crx) και Recoverin καθώς ωριμάζουν σε φωτοϋποδοχείς. Στα ανθρώπινα πολυδύναμα

52

κύτταρα η διαδικασία αυτή διαρκεί αρκετούς μήνες, εξαρτώμενη από τις συνθήκες καλλιέργειας. Οι δείκτες για τα κωνία εμφανίζονται νωρίτερα από τους δείκτες των ραβδίων.



Εικόνα 45: Α. Η βλαστοκύστη σχηματίζεται 4.5 μέρες μετά τη σύλληψη. Η εσωτερική κυτταρική μάζα σχηματίζει όλους τους ιστούς του εμβρύου. Β. Ο δίστιβος εμβρυϊκός δίσκος (επιβλάστη και υποβλάστη). Γ. Η επιβλάστη δίνει γένεση στα 3 βλαστικά δέρματα.

Τα **πρωτόκολλα διαφοροποίησης** πολυδύναμων κυττάρων σε κύτταρα αμφιβληστροειδούς in vitro μπορούν να διαχωριστούν σε πρωτόκολλα **αυτόματης** ή **κατευθυνόμενης** διαφοροποίησης. Στην αυτόματη διαφοροποίηση τα κύτταρα διαφοροποιούνται σε σειρές κυττάρων αμφιβληστροειδούς απουσία εξωγενών αυξητικών παραγόντων ενώ στην κατευθυνόμενη διαφοροποίηση εξωγενείς μεταγραφικοί παράγοντες, πρωτεΐνες και μικρά μόρια προστίθενται προκειμένου να κατευθύνουν τη διαφοροποίηση με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από άποψη χρόνου και κυτταρικής διαφοροποίησης. (Πίνακας 3,4)

Στην **αυτόματη διαφοροποίηση**, τα πολυδύναμα κύτταρα διαφοροποιούνται μόνο με την αλλαγή του μέσου καλλιέργειας σε ένα μέσο χωρίς αυξητικούς παράγοντες. Μετά από 20-25 εβδομάδες, πολλαπλές μικρές χρωστικοφόρες αποικίες κυττάρων μελαγχρόου επιθηλίου παρατηρούνται στην καλλιέργεια. Η διαδικασία αυτή βασίζεται στην αυτόματη ικανότητα των πολυδύναμων κυττάρων να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα και των 3 βλαστικών δερμάτων οπότε η αποτελεσματικότητα της μεθόδου είναι χαμηλή (<10%). Τα κύτταρα αυτά είναι λίγα σε

αριθμό και χρειάζονται ανακαλλιέργεια ώστε να πολλαπλασιαστούν και να λάβουμε ικανό αριθμό κυττάρων για μεταμόσχευση.

Τα πρωτόκολλα **κατευθυνόμενης διαφοροποίησης** βασίζονται στη γνώση των βασικών αρχών της εξελικτικής νευροβιολογίας. Είναι γνωστό ότι η διαφοροποίηση του αμφιβληστροειδούς ελέγχεται από ένα δίκτυο σηματοδοτικών μονοπατιών που επηρεάζουν την ταυτότητα των κυτταρικών πληθυσμών. Οπότε με τη χρήση των κατάλληλων εξωγενών παραγόντων μπορεί η διαφοροποίηση να κατευθυνθεί προς τον επιθυμητό κυτταρικό τύπο. Από τα πιο σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια της διαφοροποίησης σε κύτταρα αμφιβληστροειδούς είναι τα: TGFβ, BMP, Wnt και Nodal. Πολλές μελέτες επικεντρώθηκαν στη δημιουργία μικρών μορίων και ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που στοχεύουν αυτά τα μονοπάτια καθώς και τα SB431542, Noggin, DKK1, LEFTY-A, Activin A. Ειδικά ο IGF1 αυξάνει τη διαφοροποίηση προς κύτταρα RPE και κύτταρα νευροαμφιβληστροειδούς. Επίσης οι συνθήκες της καλλιέργειας, όπως η χρήση διαφορετικών θρεπτικών υποστρωμάτων, επηρεάζουν τη διαφοροποίηση σε RPE. Τα επίπεδα οξυγόνου επηρεάζουν την κυτταρική διαφοροποίηση, οι υποξικές συνθήκες σε μια κυτταροκαλλιέργεια πολυδύναμων κυττάρων ευνοούν τη διαφοροποίηση σε νευροεξώδερμα και αμφιβληστροειδή.

Η κατευθυνόμενη διαφοροποίηση έχει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι της αυτόματης διαφοροποίησης. Είναι πιο γρήγορη (10 εβδομάδες σε σύγκριση με τις 25 εβδομάδες που απαιτούνται για την αυτόματη διαφοροποίηση) και συνεπώς μειώνεται το κόστος κατασκευής του ιστού σύμφωνα με το GMP (Good Manufacturing Practice). Επίσης είναι πιο αποτελεσματική (60-80% συγκριτικά με <10% της αυτόματης διαφοροποίησης) οπότε είναι δυνατόν να δημιουργηθούν μεγάλοι πληθυσμοί κυττάρων χωρίς την ανάγκη ανακαλλιέργειας (cell expansion). Η μη χρήση ανακαλλιέργειας βοηθά τα κύτταρα RPE να διατηρήσουν τον επιθηλιακό τους φαινότυπο και να διατηρήσουν επιγενετικές τροποποιήσεις σε υποκινητές ή ενισχυτές γονιδίων οπότε τα κύτταρα RPE που παράγονται μοιάζουν περισσότερο με τα φυσικά RPE κύτταρα. (Sharma R et al 2020)

Reference(s)	PSC source	PSC-RPE differentiation method (timeline)	Differentiation procedure	Transplant functional validation	Validation procedure
Sharma et al. (12)	Autologous iPSCs	Directed differentiation (monolayer culture, 11 weeks)	<ol style="list-style-type: none"> iPSCs grown on VTN iPSCs induced to optic neuroectoderm using LDN-193189, SB431452, CK1-7, PD0325901, IGF-1 for 12 days Optic neuroectoderm induced to committed RPE using activin and nicotinamide for 10 days Committed RPE growth phase of 22 days Enrichment of RPE progenitors using CD24 and CD56 antibodies and maturation on PLGA scaffolds for 5 weeks 	PLGA-iRPE patch validation	<ol style="list-style-type: none"> Purity by flow for PMEL17, TYRP1, BEST1, CRALBP Lacking OCT4, SSEA4, TRA1-81 by flow cytometry SEM, TEM IF for RPE65, GPNMB, COLIV, COLVIII qRT-PCR for RPE65, BEST1, GPNMB, MYRIP, TYRP1, ALDH1A3, TRPM1, OCA2 Shape metrics TER (>400 Ohm/cm²) VEGF secretion PCS phagocytosis

Πίνακας 3: Περίληψη της διαδικασίας κατασκευής κυττάρων RPE από PSCs (Sharma et al)

Reference(s)	PSC source	PSC-RPE differentiation method (timeline)	Differentiation procedure	Transplant functional validation	Validation procedure
Schwartz et al. (5, 6) Song et al. (7)	ESC (MA09), allogeneic	Spontaneous (timeline NA)	1. ESC grown on mouse feeder 2. RPEs at second passage were used for transplantation	RPE validated before purification and banking	1. IF and qRT-PCR for PAX6, ZO1, BEST1, and MITF 2. Phagocytosis, flow cytometry using phRODO particles 3. Melanin content measured spectrophotometrically 4. Lacking OCT-4 ICC and alkaline phosphatase staining
Mandai et al. (10) Okakada et al. (62, 68)	Autologous iPSCs	Directed/ spontaneous differentiation (10 months)	1. iPSC grown on patient-derived skin fibroblasts 2. iPSCs induced to neuroectoderm using Y-27632, SB431542, and GSK-3i 3. Neuroectoderm spontaneous differentiation into RPE 4. Pigmented colonies manually isolated and kept as suspension culture for 10 days 5. Microscopically isolated colonies seeded and expanded with SB431542 and FGF2 6. Third-passage cells seeded on collagen-coated transwell and maintained in FGF2 + SB431542 7. Collagenase IV treatment to lift iPSC-RPE patch	iPSC-RPE patch validation	1. Purity by BEST1/PAX6 2. >95% by immunostaining 3. TER (290 Ohm/cm ²) 4. PEDF, VEGF secretion 5. IF and qRT-PCR for RPE markers (BEST1, RPE65, MERTK, CRALBP) 6. TEM 7. Phago, FITC porcine POS
Kashani et al. (9) Pennington et al. (90)	ESC (H9), allogeneic	Spontaneous differentiation (32 weeks)	1. Spontaneous differentiation for 16 weeks on Synthemax-coated plates 2. Pigmented patches manually picked and dissociated using TrypLE and seeded on VTN-coated plates 3. Passaged 3 times in 3 months 4. Passage 3 cells seeded on VTN-coated parylene scaffold and matured for 28–35 days	Passage 2 cells validated	1. IF (ZO1, PMEL17, OTX2) and qRT-PCR (RPE65, TYR, BEST1, TYRP1, PMEL17) for RPE markers 2. Lacking OCT4 and SALL4 expression 3. POS phagocytosis 4. Polarized PEDF secretion
da Cruz et al. (8)	ESC (SHEF01), allogeneic	Spontaneous differentiation (30–58 weeks)	1. Up to 22 weeks of spontaneous differentiation on VTN-coated plates 2. Pigmented patches manually picked and expanded on CELLstart-coated plates for 5–16 weeks 3. RPE cells matured on PET membrane for 3–20 weeks	PET-RPE patch validation	1. Visual inspection 2. Loss of Lin28 3. PMEL17 ICC 4. Lacking Lin28 expression 5. PEDF secretion 6. Phagocytosis of labeled POS by IF
Ben M'Barek et al. (11)	ESC (RC-9), allogeneic	Spontaneous differentiation (17 weeks) ES line derived on fibroblast, later made feeder free using a commercially available substrate	1. Up to 5 weeks of spontaneous differentiation on CELLstart-coated plates 2. Pigmented patches manually picked and expanded on CELLstart-coated plates for another 5 weeks 3. Isolated pigmented patches expanded for 3 weeks 4. Cells matured on human amniotic membrane for 6 weeks	hAM-RPE patch validation	1. IF for MITE, TYRP1, ZO1, EZRIN, BEST1 2. TEM, SEM 3. Secretion of VEGF 4. RT for PAX6, BEST1, RPE65, MITF, OCT4, and Nanog 5. Porcine-labeled POS phagocytosis by IF

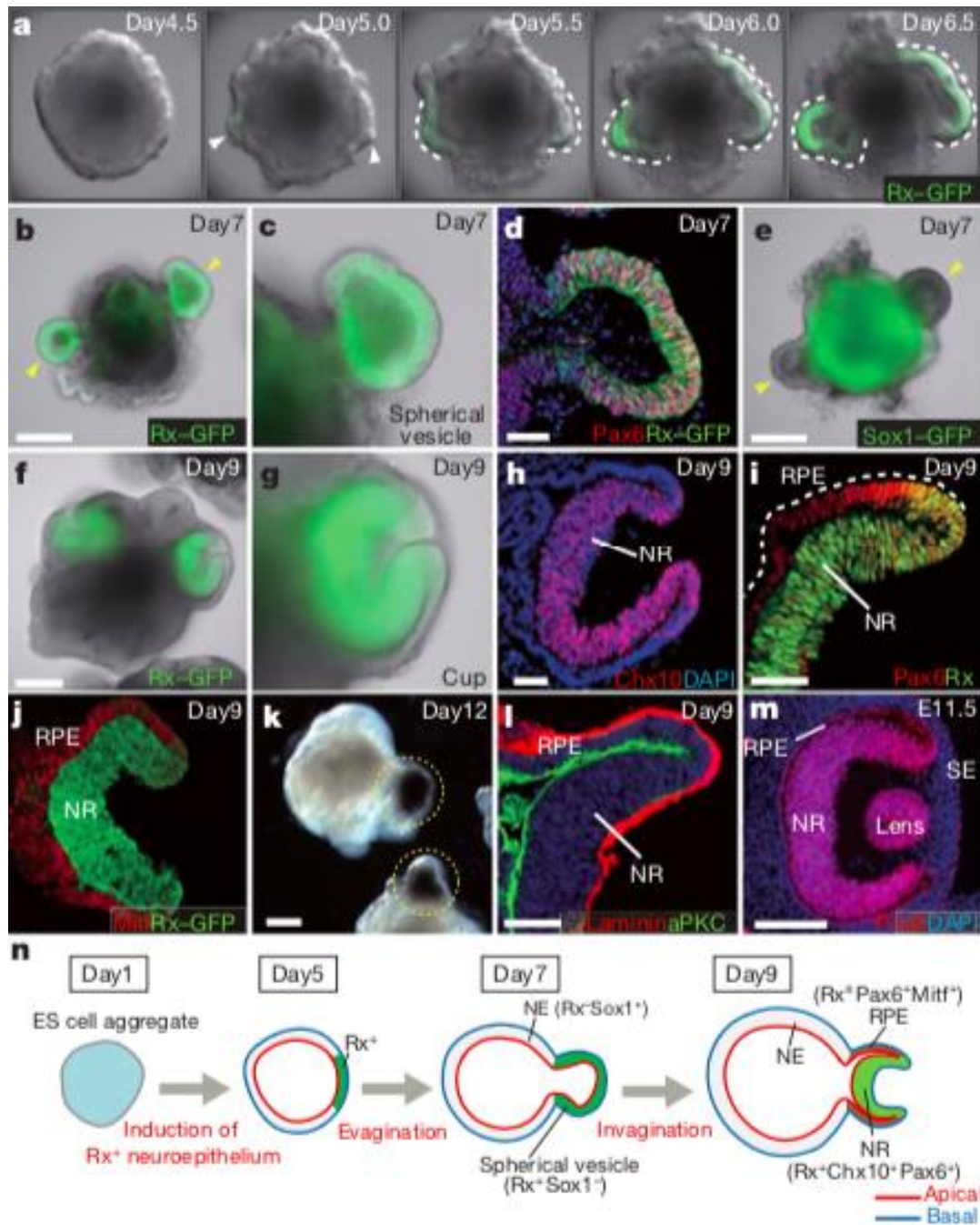
Πίνακας 4: (συνέχεια) Περίληψη της διαδικασίας κατασκευής κυτάρων RPE από PSCs (Sharma et al)

3.9 Τρισδιάστατες καλλιέργειες αμφιβληστροειδούς (Three-dimensional 3D retinal cultures)

Μια σημαντική ανακάλυψη για την διαφοροποίηση των φωτοϋποδοχέων έγινε το 2011 από τους Eiraku et al οι οποίοι κατέδειξαν ότι περιορίζοντας τα αναπτυσσόμενα PSCs σε 3D συνθήκες καλλιέργειας, μπορούσαν να αναγνωρίσουν δομές αμφιβληστροειδούς. Ο

56

αμφιβληστροειδής αναδύθηκε από μια δομή νευροεξωδέρματος που μιμούνταν το πρόσθιο τμήμα του αρχέγονου πρόσθιου εγκεφάλου, με τις οπτικές αύλακες να προβάλλουν και να σχηματίζουν οπτικά κυστίδια τα οποία στη συνέχεια εγκολπώνονται αυτόματα για να σχηματίσουν μια δομή διπλού τοιχώματος, το οπτικό κύπελλο (optic cup) χωρίς την παρουσία επιφανειακού εξωδέρματος. (Εικόνα 46) (Eiraku M et al 2011)



Εικόνα 46: Αυτόματη δημιουργία μιας δομής προσομοιάζουσας με το οπτικό κύπελλο σε τρισδιάστατη καλλιέργεια συναθροίσεων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων

57

a-e SFEbq/Matrigel καλλιέργεια, αυτόματη δημιουργία κυστιδίων που εκφράζουν Rx-GFP(*a-c*) και Pax6(*d*) αλλά όχι Sox1-GFP(*e*).

f-i Rx-GFP+ δομές οφθαλμικού κυπέλλου τη μέρα 9 (εντόνως θετικό στον νευροαμφιβληστροειδή και ασθενές στο RPE).

h,i Το εσωτερικό τμήμα εκφράζει έντονα το Chx10(*h*) και Rx και μέτρια τον Pax6 (*i*) την ημέρα 9

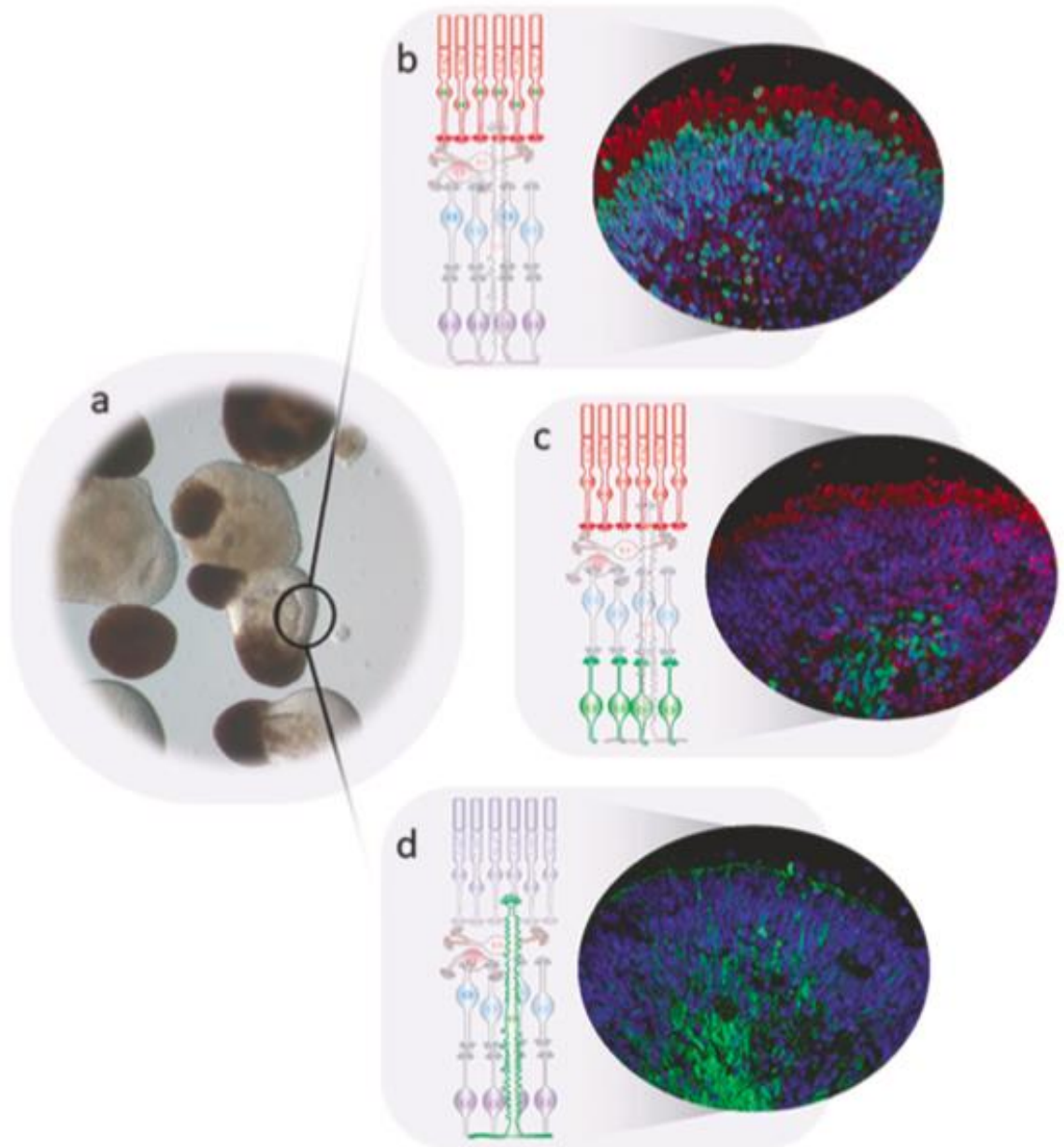
j,k Το έξω επιθηλιακό περίβλημα του οπτικού κυπέλλου εκφράζει τον *Mitf* (*j*) την 9^η ημέρα ενώ την 12^η ημέρα συσσωρεύεται και χρωστική (*k*)

l Ο δείκτης της κορυφαίας επιφάνειας του RPE *aPKC* και βασική μεμβράνη *laminin+*

m Ημέρα 11.5 οφθαλμός ποντικού

n Σχηματικό διάγραμμα της αυτοδημιουργίας του οπτικού κυπέλλου

Αρκετά εργαστήρια μπόρεσαν να αναπαράγουν το αποτέλεσμα με hiPSCs και να παράγουν ‘οργανοειδή αμφιβληστροειδούς’ που φαίνεται να διατηρούν την οργάνωση του αμφιβληστροειδούς σε στιβάδες όπως ακριβώς και *in vivo*, με όλους τους κυτταρικούς τύπους που συναντώνται σ’ έναν ώριμο αμφιβληστροειδή. Η τεχνολογία αυτή έχει μεγάλες δυνατότητες για τη βελτίωση της ωρίμανσης των φωτοϋποδοχέων προ της μεταμόσχευσης, προσφέρει τη δυνατότητα για μεταμόσχευση φύλλων αμφιβληστροειδούς, μοντελοποίηση νόσων, τοξικολογία και έλεγχο φαρμάκων. (Εικόνα 47)



Εικόνα 47: Οργανοειδή αμφιβληστροειδούς με παρακείμενο μελάγχρουν επιθήλιο. Τρισδιάστατη διαφοροποίηση από ανθρώπινα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα.

a. Οπτικά κυστίδια με στιβαδοποίηση αμφιβληστροειδούς.

b-d. Διαγραμματική απεικόνιση των στιβάδων του αμφιβληστροειδούς με σχηματική σήμανση αντισωμάτων δίπλα στην πραγματική ιστολογική τομή σημασμένη με αντισώματα.

b Φωτούποδοχείς σημασμένοι με CRX (πράσινο) και Recoverin (κόκκινο)

c Φωτούποδοχείς με Recoverin (κόκκινο) και γαγγλιακά κύτταρα με HuC/D (πράσινο)

d Νευρογλοιακά κύτταρα Muller (πράσινο)

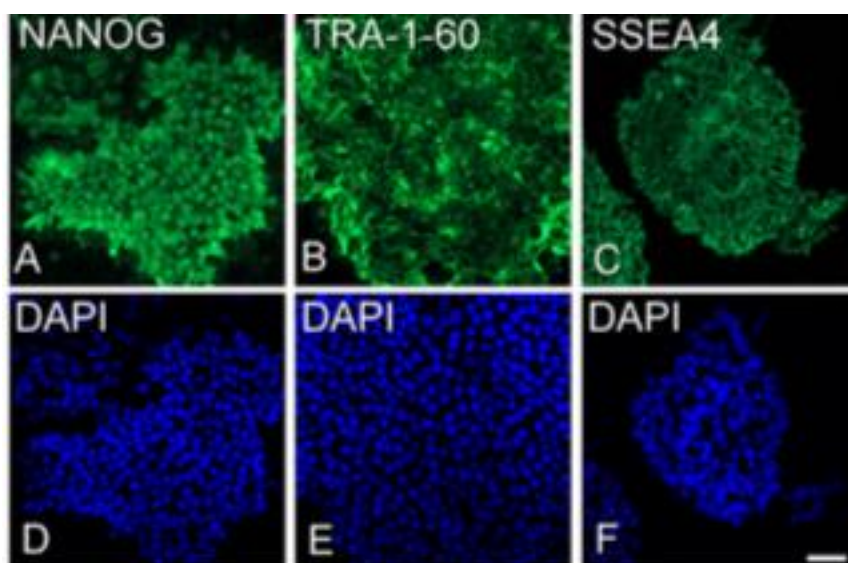
3.10 Χαρακτηριστικά του RPE

Το μελάγχρουν επιθήλιο μπορεί εύκολα να αναγνωριστεί από τα χαρακτηριστικά του (4Ps: pigmented, polygonal, polarized, phagocytic) ακόμη από τα πρώτα στάδια μιας καλλιέργειας και κατόπιν να απομονωθεί και να ωριμάσει. Η ωριμότητα του μελαγχρού επιθηλίου μπορεί να εκτιμηθεί από μια ποικιλία μορφολογικών, μοριακών και λειτουργικών χαρακτηριστικών (Εικόνα 48,49,50). Ειδικοί δείκτες για το RPE περιλαμβάνουν:

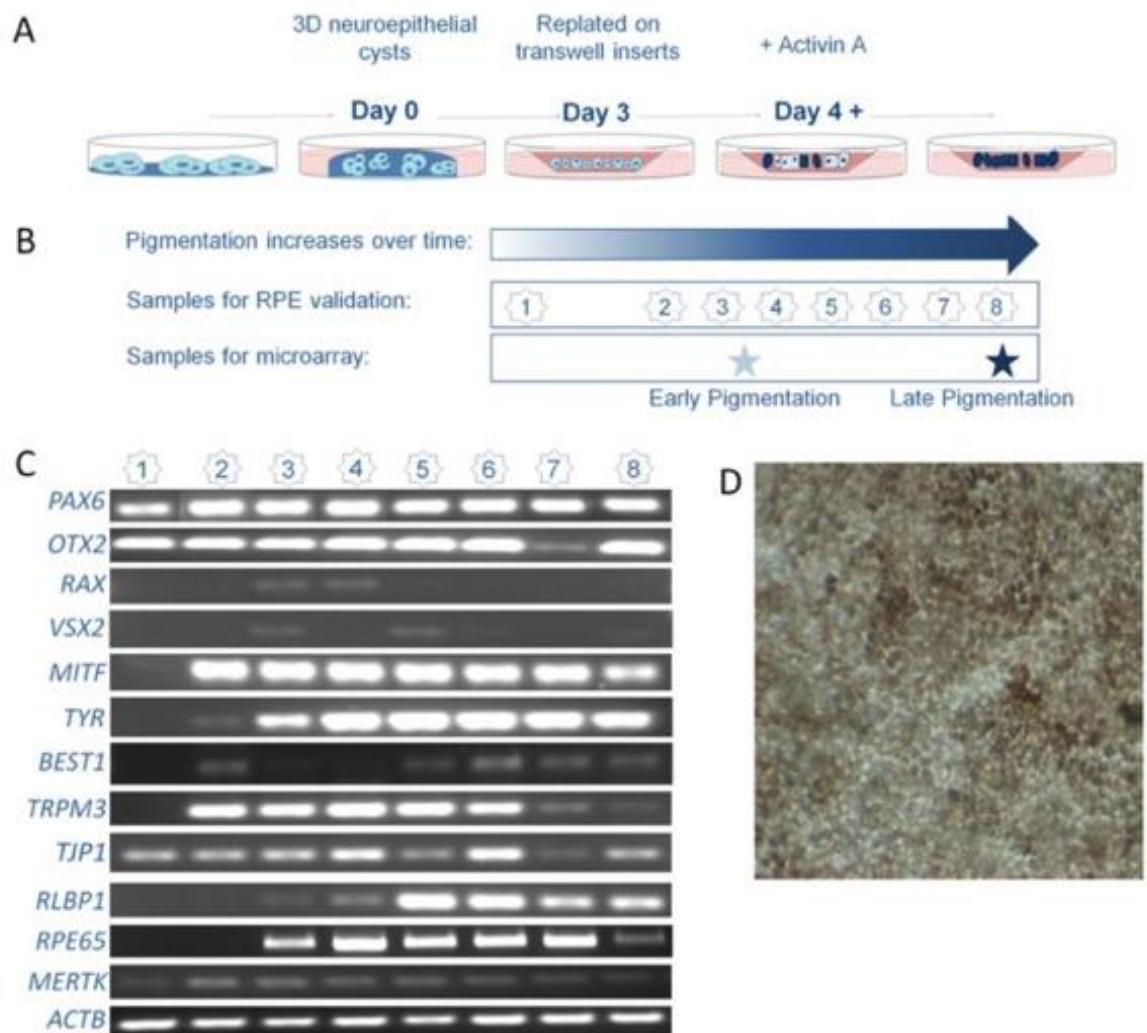
- Δείκτες φαγοκυττάρωσης: MERTK
- Δείκτες βασικής επιφάνειας: BEST1
- Δείκτες κορυφής του κυττάρου: Na⁺/K⁺ ATPase
- Δείκτες που σχετίζονται με τον οπτικό κύκλο: RPE65, LRAT, CRALB

Η φαγοκυττάρωση, η επιθηλιακή αντίσταση (trans-epithelial resistance) και η πολικότητα στην έκκριση αυξητικών παραγόντων (κορυφή PEDF/ βάση VEGF) μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτες λειτουργίας. (Chichagova V et al 2018)

Η κατάλληλη ηλικία των κυττάρων RPE προς μεταμόσχευση δεν είναι γνωστή, αλλά γενικά τα κύτταρα RPE μεταμοσχεύονται μόλις εκφράσουν δείκτες ωριμότητας.



Εικόνα 48: Human protein iPSCs έχουν σημειωθεί με δείκτες πολυδυναμίας μετά από καλλιέργεια με εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού. Η χρώση με ανοσοφθορισμό ήταν θετική για δείκτες πολυδυναμίας (A) NANOG (B) TRA-1-60 (C) SSEA-4. Οι πυρήνες των κυττάρων A-C έχουν χρωσθεί με DAPI (D-F).



Εικόνα 50: (α) Σχηματική αναπαράσταση ενός πρωτοκόλλου διαφοροποίησης hESC-RPE από τους Zhu et al. (β) Το διάγραμμα δείχνει διαφορετικές χρονικές στιγμές συλλογής δειγμάτων για αξιολόγηση της δημιουργίας hESC-RPE (1 = 3 days, 2 = 10–12 days, 3 = 20–25 days, 4 = 30–35 days, 5 = 40–45 days, 6 = 50–55 days, 7 = 60–63 days, 8 = 70 days) (c) Ανάλυση με RT-PCR στις χρονικές στιγμές 1-8 κατέδειξε απουσία και έκφραση χαρακτηριστικών γονιδίων του RPE. (d) Τα hESC-RPE κύτταρα άρχισαν να εμφανίζουν φαινόμενο χρωστικοφόρων κυττάρων και τυπική εξαγωνική μορφολογία στις 30-35 ημέρες.

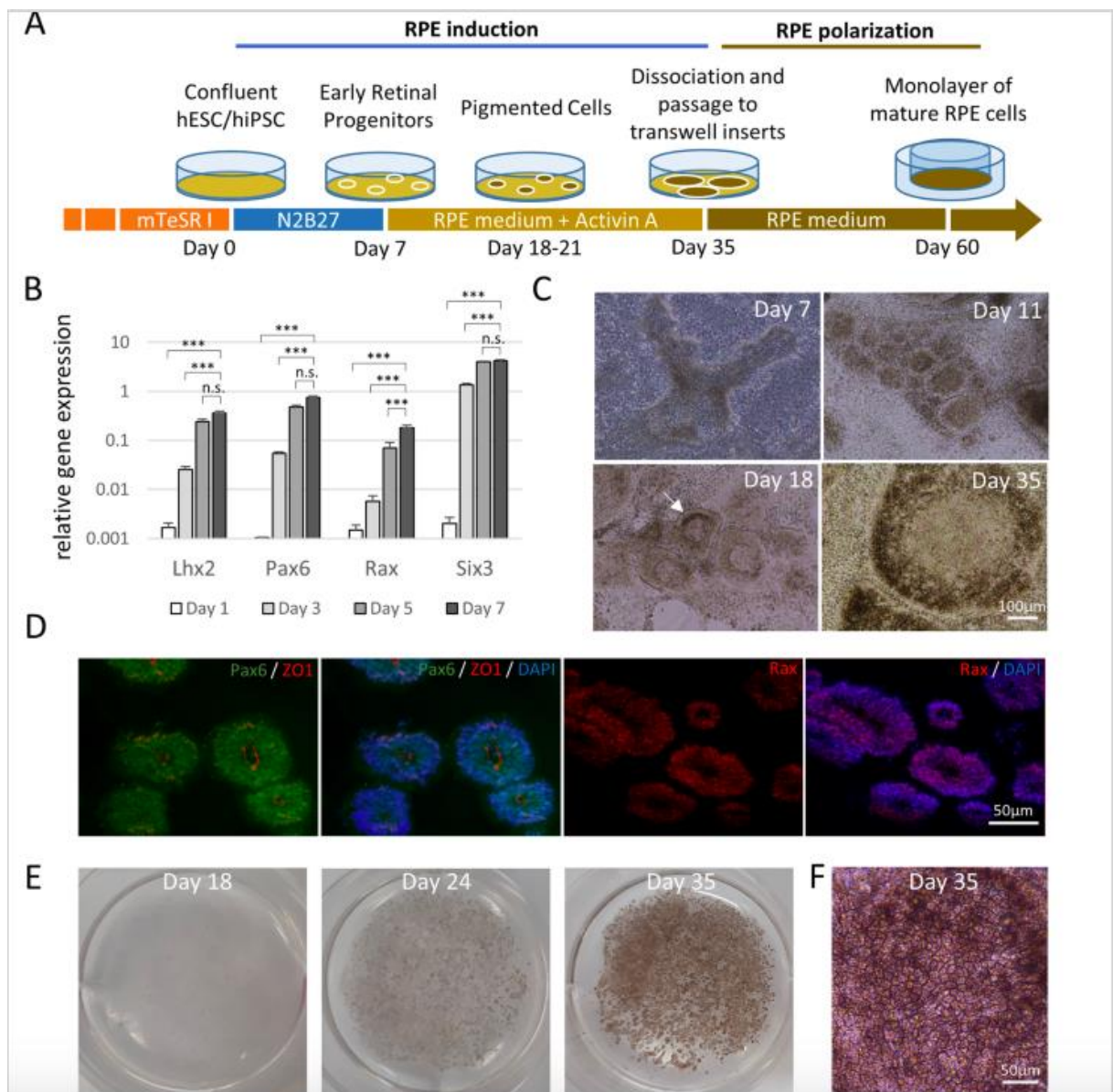
3.11 Πρωτόκολλα διαφοροποίησης του RPE

Έχουν προταθεί αρκετά πρωτόκολλα διαφοροποίησης των hESC/iPSCs σε ώριμα και λειτουργικά κύτταρα RPE. Τα περισσότερα περιλαμβάνουν μια προσέγγιση 2 βημάτων (2 step protocols): το στάδιο της επαγωγής (induction) και το στάδιο της πόλωσης (polarization). Το στάδιο της επαγωγής κατευθύνει τα πολυδύναμα κύτταρα προς αμφιβληστροειδικά προγονικά κύτταρα και κατόπιν σε ανώριμα κύτταρα RPE. Στο στάδιο της πόλωσης, τα νεαρά κύτταρα RPE αποκτούν μορφολογία ώριμων κυττάρων και γίνονται λειτουργικά. Ένα τέτοιο πρωτόκολλο διαφοροποίησης περιγράφεται στην Εικόνα 51α. (Michelet F et al 2020)

Όταν τα πολυδύναμα κύτταρα φτάσουν να συρρέουν σε μια κυτταροκαλλιέργεια, γίνεται αλλαγή στο θρεπτικό υπόστρωμα των βλαστικών κυττάρων σε θρεπτικό υπόστρωμα που επάγει την διαφοροποίηση προς νευρική σειρά. Τα κύτταρα παραμένουν στο υπόστρωμα αυτό για 7 ημέρες. Αυτή η απλή τεχνική είναι αρκετή προκειμένου να εκφραστούν τα γονίδια του οφθαλμικού πεδίου (eye field genes LHX2, PAX6, RAX, SIX3) και να εκτρέψουν τα πολυδύναμα κύτταρα προς αμφιβληστροειδικούς προγόνους σε μόλις 5-7 ημέρες (Εικ 51b).

Την 7^η ημέρα, τα κύτταρα μεταφέρονται και διατηρούνται σε θρεπτικό υπόστρωμα με Activin A που ευνοεί την εκτροπή προς κύτταρα RPE. Τα κύτταρα παραμένουν στην ίδια 2D καλλιέργεια και στο ίδιο τρυβλίο καθ' όλη τη διαδικασία. Από την 11^η-12^η ημέρα, αρχίζουν να εμφανίζονται δακτυλιοειδείς δομές μέσα στην καλλιέργεια (Εικ. 51c). Ο ανοσοφθορισμός καταδεικνύει ότι αυτές οι δομές εκφράζουν επαρκώς πρώιμους αμφιβληστροειδικούς δείκτες PAX6 και RAX καθώς και τον νευροεπιθηλιακό δείκτη ZO1 (Εικ 51d).

Με την πάροδο του χρόνου αυτές οι επίπεδες νευροεπιθηλιακές κύστες αυξάνονται σε αριθμό και τελικώς χρωστικοφόρα κύτταρα αρχίζουν να αναπτύσσονται στα όρια των αρχικών κυστικών δομών περίπου την 21^η με 23^η ημέρα (Εικ. 51c). Αυτές οι περιοχές με χρωστική γίνονται εμφανείς πλέον και μακροσκοπικά (Εικ. 51e). Κατόπιν η Activin A αποσύρεται από το μέσο καλλιέργειας μέχρι την ημέρα 30-35 που τα χρωστικοφόρα κύτταρα αναπτύσσονται και καλύπτουν το 35-40% της συνολικής επιφάνειας (Εικ. 51e). Σε αυτό το στάδιο τα χρωστικοφόρα κύτταρα εμφανίζουν την τυπική μορφολογία πλακόστρωτου των ώριμων ανθρώπινων RPE κυττάρων (Εικ. 51f).



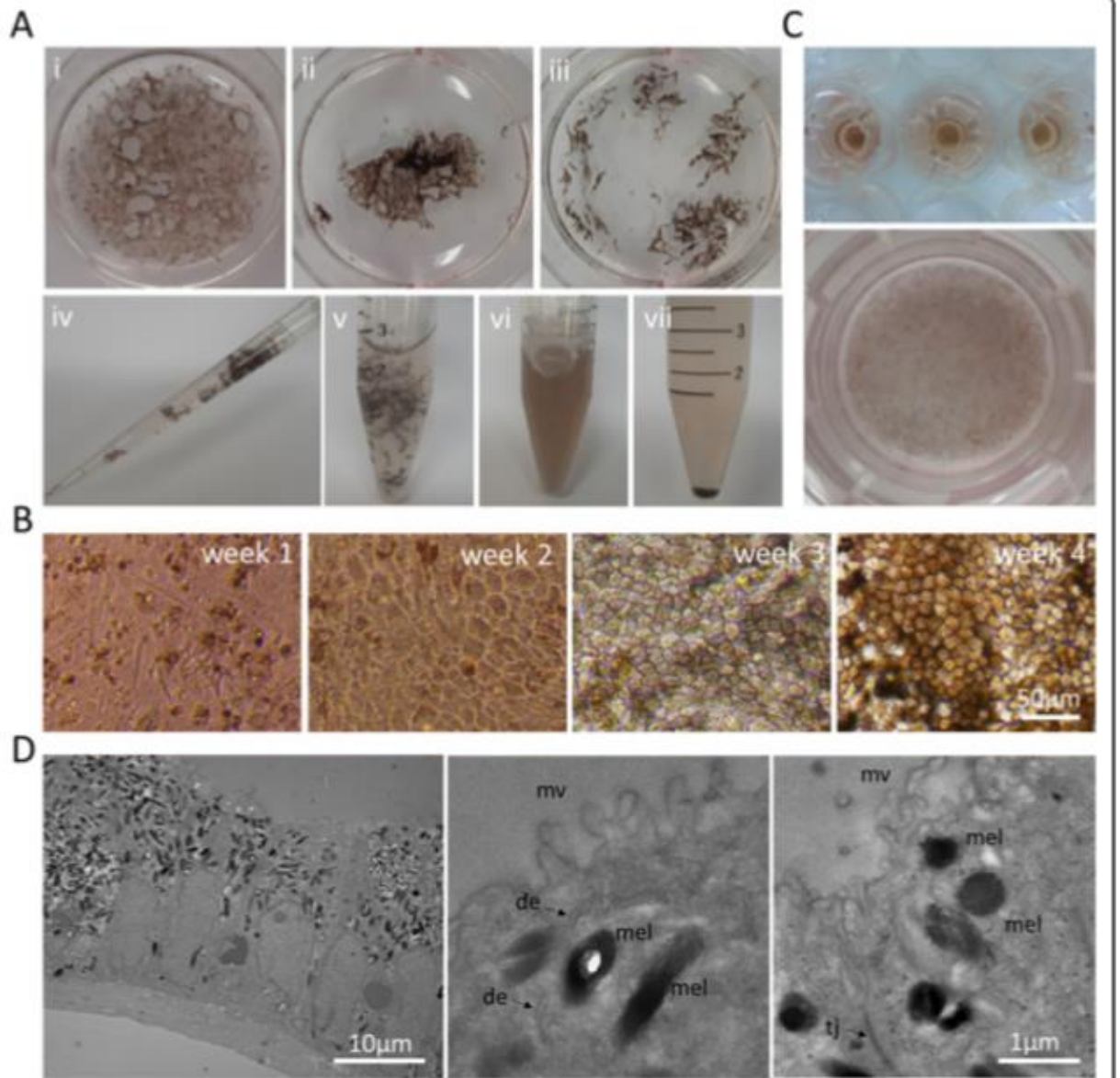
Εικόνα 51: Διαφοροποίηση κυττάρων RPE από hESC/hiPSCs.

Στο τέλος της φάσης επαγωγής, υπάρχει μεγάλος αριθμός μη χρωστικοφόρων κυττάρων που 'επιμολύνουν' την καλλιέργεια. Περαιτέρω απομόνωση και ωρίμανση των κυττάρων RPE επιτυγχάνεται στο στάδιο της πόλωσης με την καλλιέργεια των κυττάρων πάνω σε διαπερατές μεμβράνες (transwell permeable membranes). Όταν το 35-40% της επιφάνειας καλυφθεί με χρωστικοφόρα κύτταρα (περίπου την ημέρα 30-35), τα κύτταρα επιστρώνονται σε διαπερατές μεμβράνες που προάγουν την ωρίμανση του RPE. Οι μεμβράνες αυτές υποστηρίζουν την ανάπτυξη των επιθηλιακών κυττάρων σε μια μονή σιβάδα και ευνοούν την ανάπτυξη στενών συνάψεων (tight

junctions) μεταξύ των κυττάρων καθώς και την εμφάνιση πολικότητας που είναι απαραίτητη για τη λειτουργία των κυττάρων RPE.

Για τη μεταφορά τους πάνω σε διαπερατές μεμβράνες, τα κύτταρα θα πρέπει να διαχωριστούν σε ένα εναιώρημα κυττάρων. Λόγω της μεγάλης ποσότητας πρωτεϊνών εξωκυττάριας ουσίας που παράγουν αυτά τα κύτταρα στη φάση της επαγωγής, ο διαχωρισμός τους σε μονήρη κύτταρα είναι δύσκολος. Τα κύτταρα διαχωρίζονται εύκολα από το τρυβλίο της αρχικής καλλιέργειας αλλά χρειάζονται περαιτέρω τεμαχισμό χρησιμοποιώντας την κορυφή μιας πιπέτας για να τεμαχιστούν σε μικρότερα κομμάτια (Εικ.52a i-iii). Όταν τα θραύσματα είναι αρκετά μικρά για να επαναιωρηθούν (Εικ.52a iv), επωάζονται για 10 λεπτά με Accutase στους 37°C. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για 5-10 λεπτά ώστε να διασφαλιστεί η παραγωγή ενός εναιωρήματος μονών κυττάρων (single cell suspension)(Εικ.52a v,vi). Το εναιώρημα φιλτράρεται σε έναν κυτταρικό ηθμό 40μm και τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται ώστε να ληφθεί ένα ίζημα κυττάρων (Εικ 52 a vii).

Ακολούθως τα κύτταρα επιστρώνονται σε διαπερατές μεμβράνες επικαλυμμένες με Laminin 521 σε συγκέντρωση 500,000 κυττάρων/cm² σε θρεπτικό υπόστρωμα για RPE. Την επόμενη ημέρα περίπου 10-40% των κυττάρων προσφύεται στην επιφάνεια της διαπερατής μεμβράνης. Τα κύτταρα περνούν από ένα κύκλο αποδιαφοροποίησης, επέκτασης και επαναδιαφοροποίησης για να αποκτήσουν τελικά την τυπική μορφολογία πλακόστρωτου με αυξημένα επίπεδα χρώσης (Εικ. 52b,c). Η διαδικασία αυτή διαρκεί 30-40 ημέρες. Το RPE που παράγεται είναι πλήρως πολωμένο και όπως φαίνεται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, με κυλινδρικό σχήμα και μικρολάχνες στην κορυφαία επιφάνειά του (Εικ. 52d).

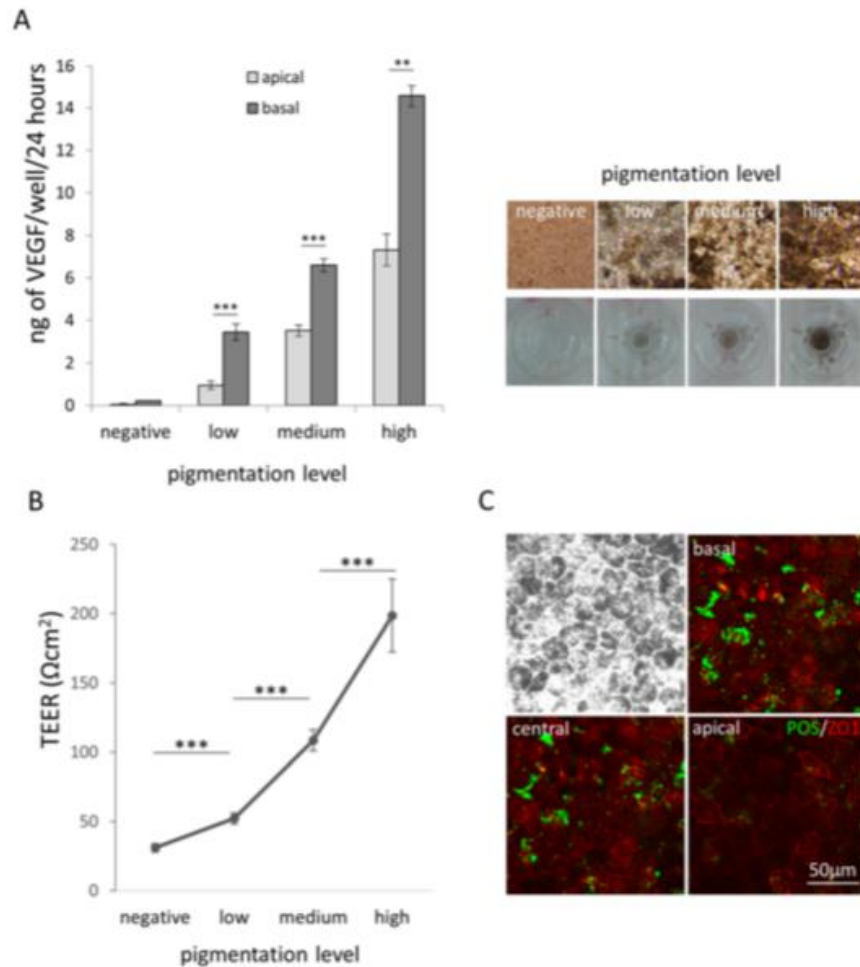


Εικόνα 52: Επέκταση και διαφοροποίηση πολωμένων RPE κυττάρων πάνω σε διαπερατές μεμβράνες.

Αξιολόγηση της λειτουργικότητας του παραγόμενου RPE

Τα hESC-derived RPE κύτταρα εκφράζουν τον VEGF με έναν παρόμοιο τρόπο με τα κύτταρα RPE in vivo όπου αυτή η λειτουργία υποστηρίζει την ανάπτυξη και την ομοίωση των χοριοτριχοειδών που έρχονται σε επαφή με τη βασική επιφάνεια των κυττάρων RPE. Ανάλυση με ELISA της βασικής και κορυφιαίας επιφάνειας των καλλιεργούμενων RPE κυττάρων σε διαπερατές

μεμβράνες, κατέδειξε την πολωμένη έκφραση VEGF. Το επίπεδο της έκφρασης είναι ανάλογο της χρώσης των κυττάρων (Εικ. 53 a).



Εικόνα 53: Λειτουργική αξιολόγηση των hESC-derived RPE κυττάρων in vitro

Επιπλέον, το RPE που καλλιεργείται με αυτόν τον τρόπο δημιουργεί στενές συνάψεις μεταξύ των κυττάρων, παρόμοιες με τις αντίστοιχες in vivo όπως καταδεικνύεται με τα υψηλά επίπεδα TEER (Trans-epithelial electric resistance) in vitro. Με την πάροδο του χρόνου και καθώς αυξάνεται η χρωστική των κυττάρων, οι τιμές TEER αυξάνουν (Εικ. 53b).

Τέλος, τα κύτταρα RPE που παράγονται έχουν την ικανότητα να φαγοκυτταρώνουν τα εξωτερικά τμήματα των φωτοϋποδοχέων (photoreceptor outer segments, POS), μια λειτουργία που in vivo είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του κύκλου της όρασης και την ομοίωση των φωτοϋποδοχέων. Η επώαση των RPE με σημασμένα POS κατέδειξε την απουσία POS από την

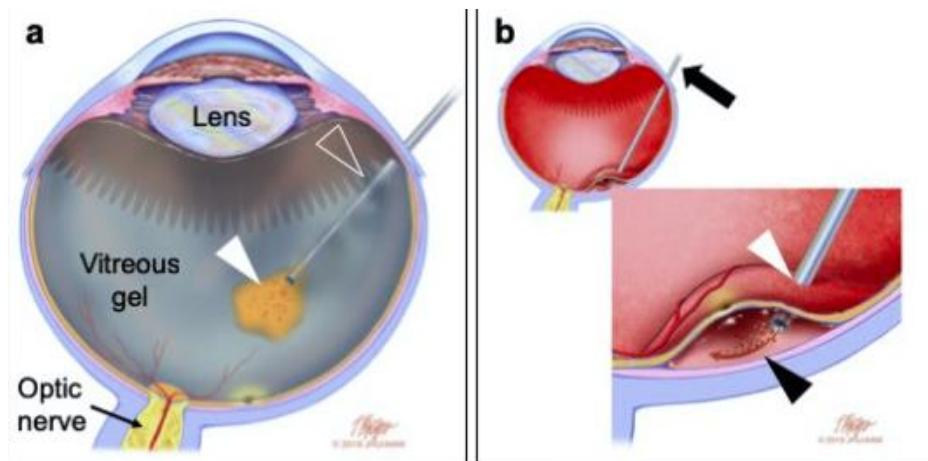
κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων και παρουσία τους στην κεντρική και βασική μοίρα των κυττάρων RPE. Συνεπώς, τα τμήματα των φωτοϋποδοχέων δεν ανιχνεύθηκαν στην επιφάνεια των κυττάρων αλλά φαγοκυτταρώθηκαν ενεργά από τα κύτταρα RPE (Εικ. 53c). (Michelet F et al 2020)

3.12 Στρατηγικές χορήγησης του RPE που προέρχεται από PSCs

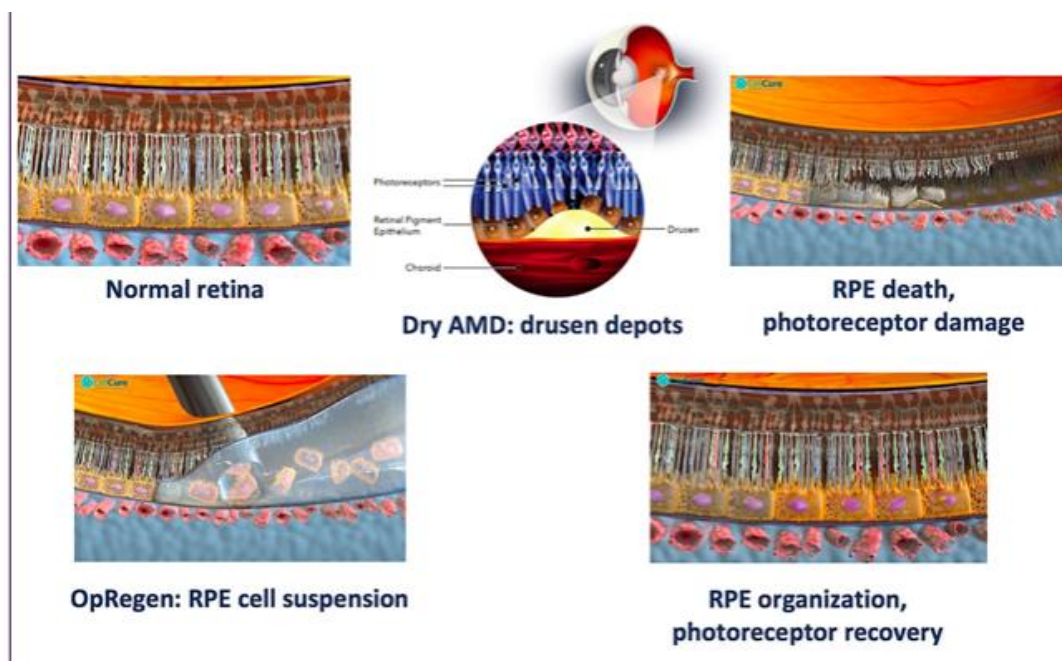
Η επιτυχημένη αντικατάσταση κυττάρων δεν περιλαμβάνει μόνο την ικανότητα παραγωγής και απομόνωσης των επιθυμητών κυτταρικών τύπων αλλά τα κύτταρα αυτά θα πρέπει να χορηγηθούν επιτυχώς υπαμφιβληστροειδικά, να επιβιώσουν και να είναι ικανά να αντικαταστήσουν τη λειτουργία των εκφυλισμένων κυττάρων. Για την αντικατάσταση του RPE, οι δύο κυριότερες μέθοδοι που έχουν μελετηθεί είναι η χορήγηση εναιωρήματος κυττάρων και η μεταμόσχευση 'φύλλου' RPE.

Εναιώρημα κυττάρων RPE

Η μεταμόσχευση εναιωρήματος κυττάρων RPE στον υπαμφιβληστροειδικό χώρο φάνηκε να προστατεύει τους φωτοϋποδοχείς από εκφύλιση σε περιστατικά ηλικιακής εκφύλισης του αμφιβληστροειδούς (Εικόνα 54,55).



Εικόνα 54: Μεταμόσχευση εναιωρήματος κυττάρων RPE. Πραγματοποιείται υαλοειδεκτομή (a) και κατόπιν δημιουργείται τεχνητά μια αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς και έγχυση των κυττάρων υπαμφιβληστροειδικά (b).



Εικόνα 55: Σχηματική αναπαράσταση της χορήγησης υπό τον αμφιβληστροειδή κυττάρων RPE προερχόμενα από hESCs σε ξηρή AMD.

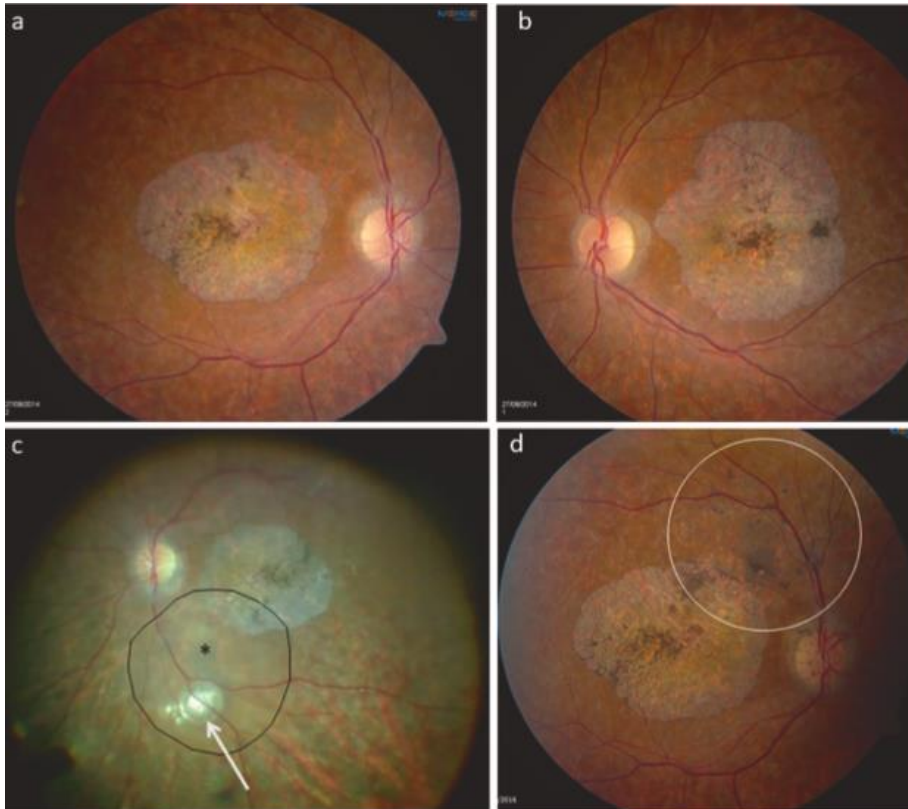
Οι πρώτες μελέτες σε ανθρώπους φάσης I/II έγιναν από την εταιρία Ocata Therapeutics (νυν Astellas) για να αξιολογηθεί η έγχυση υπό τον αμφιβληστροειδή εναιωρήματος κυττάρων RPE προερχόμενων από hESCs σε ασθενείς με προχωρημένη ξηρά AMD. Χρησιμοποιήθηκε συστηματική ανοσοκαταστολή των ασθενών με tacrolimus και mycophenolate. Τεκμηριώθηκε η ασφάλεια και η ανεκτικότητα της μεθόδου και ορισμένοι ασθενείς εμφάνισαν βελτίωση της οπτικής τους οξύτητας σε σύγκριση με τον έτερο οφθαλμό. Βυθοσκοπικά οι ασθενείς εμφάνισαν προοδευτικά αυξανόμενες αθροίσεις χρωστικοφόρων κυττάρων υπό τον αμφιβληστροειδή στο σημείο της έγχυσης που θα μπορούσαν να αντιστοιχούν σε αναπτυσσόμενα κύτταρα RPE. Η βιωσιμότητα και η λειτουργικότητα τους όμως παρέμενε αμφίβολη από τη στιγμή που δεν μπορούσαν να δώσουν θετικό σήμα στον αυτοφθορισμό (Εικόνα 56). (Chichagova V et al 2018)

Η κατανομή των συναθροίσεων χρωστικής δεν ήταν ομοιόμορφη και διαπιστώθηκε απουσία χρωστικής στο κέντρο της ατροφίας. Μια πιθανή εξήγηση γι' αυτήν την ανομοιογένεια είναι το ότι στην AMD υπάρχουν αρκετές διαταραχές στη μεμβράνη του Bruch όπως πάχυνση, μειωμένη αποδόμηση εξωκυττάριας ουσίας και εναπόθεση πρωτεϊνικού υλικού και λιπιδίων. Οι αλλαγές αυτές στη μεμβράνη του Bruch έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση των ιντεγκρινών

(προσδέτες κυτταρικής επιφάνειας με την εξωκυττάρια ουσία), λαμινίνης, φιμπρονεκτίνης και βιτρονεκτίνης. Ως συνέπεια,

69

επιηρεάζεται η ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων RPE και η δημιουργία μονής στιβάδας κυττάρων που είναι απαραίτητη για τη λειτουργία και την επιβίωσή τους.



Εικόνα 56: Ασθενής με συμμετρική ατροφία ωχράς κηλίδας (a,b). Ο ασθενής υποβλήθηκε σε υαλοειδεκτομή με έγχυση υπό τον αμφιβληστροειδή εναιωρήματος κυττάρων RPE προερχόμενων από hESCs. Η έγχυση έγινε άνω και ρινικά της ωχράς (c). Η εικόνα είναι διεγχειρητική και ανεστραμμένη. Με τον μαύρο αστερίσκο φαίνεται το σημείο της ένεσης, η έκταση της περιοχής της έγχυσης φαίνεται με τον μαύρο κύκλο με μια μικρή φυσαλίδα αέρα υπαμφιβληστροειδικά (άσπρο βέλος). Εννέα μήνες μετεγχειρητικά παρατηρείται χρωστική στην περιοχή της έγχυσης (d).

Φύλλο RPE (RPE sheet)

Η δημιουργία μιας στιβάδας κυττάρων με πολικότητα κορυφής-βάσης καθώς και πρόσφυσης σε μια επιφάνεια είναι απαραίτητες για τη λειτουργία και την επιβίωση των RPE

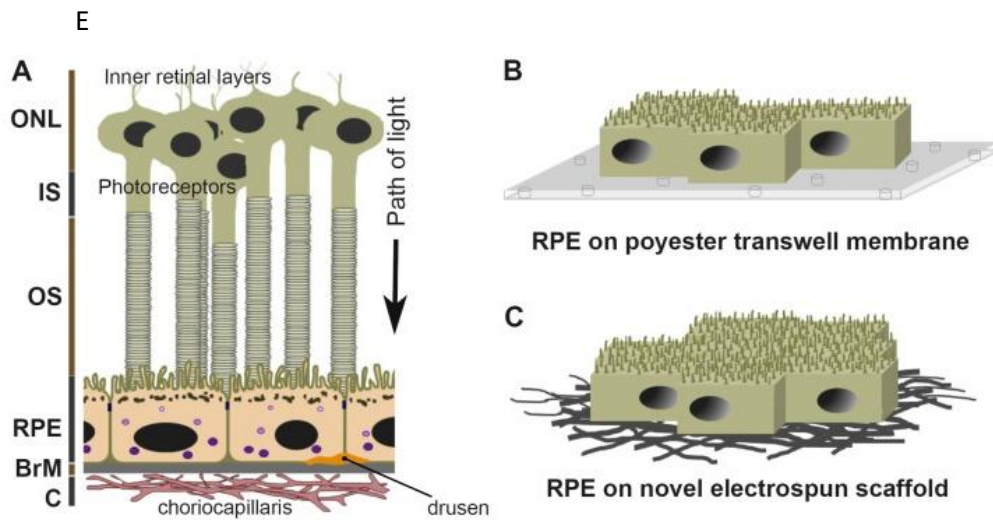
κυττάρων. Μια άλλη προσέγγιση λοιπόν είναι η μεταμόσχευση των RPE κυττάρων σαν μονοστιβάδα πάνω σε ικρίωμα (scaffold) που υποκαθιστά τη μεμβράνη του Bruch (Εικόνα 57).

70

Στην AMD, η μεμβράνη του Bruch έχει υποστεί αλλοιώσεις που επηρεάζουν την πρόσφυση των κυττάρων μεταξύ τους και με τους παρακείμενους ιστούς. Η χρήση μιας μεμβράνης ικρίωματος (scaffold) μπορεί να μιμηθεί μια υγιή μεμβράνη του Bruch και να βοηθήσει στην καλύτερη ενσωμάτωση των μεταμοσχευμένων RPE κυττάρων. Το ιδανικό ικρίωμα θα πρέπει:

- Να είναι ιστοσυμβατό και να μην προκαλεί φλεγμονή
- Να προάγει και να διατηρεί έναν υγιή φαινότυπο RPE
- Να μιμείται τις ιδιότητες της υγιούς μεμβράνης του Bruch
- Να είναι εφικτό να κατασκευαστεί σε διαστάσεις 5-90 μm
- Να είναι μηχανικά ανθεκτικό ώστε να αντέξει τους χειρουργικούς χειρισμούς κατά την εμφύτευση.

Γενικά για τα ικρίωματα χρησιμοποιούνται υλικά φυσικά ή συνθετικά ή συνδυασμός και των δύο (Πίνακας 5). (White CE and Olabisi RM 2017)



Εικόνα 57: Σχηματική αναπαράσταση μονοστιβάδας RPE πάνω σε ικρίωματα που μιμούνται τη μεμβράνη του Bruch.

Table 1. Summary of scaffolds used to support RPE cells.

	Scaffold material	Cell types	In vitro characterization/in vivo results
Native membranes and explants	Anterior lens capsule	Aged human RPE; porcine RPE	In vitro: Over 94% cell viability. Confluent cells expressed F-actin and tight junctions In vivo: 2 weeks post-implantation, lens capsule well tolerated in subretinal space
	BM explants layers	Fetal RPE	In vitro: Poor cell morphology and low cell density compared to controls In vivo: N/A
	ECM-coated BM	Human fetal RPE; ARPE19	In vitro: Cleaning explants and ECM protein coating decreased apoptosis, increased proliferation ratios, and formed monolayer after 17 days of culture In vivo: N/A
	Amniotic membrane	Primary rabbit RPE; human RPE	In vitro: RPE showed epithelial cell characteristic gene expression and morphological ultrastructure of including apical microvilli and tight junctions In vivo: N/A
	Descemet's membrane	Porcine and bovine RPE	In vitro: RPE cells formed intact monolayer and characteristic apical microvilli In vivo: N/A
Natural materials	Collagen	ARPE19, human primary RPE	In vitro: RPE demonstrated hexagonal, cobblestone morphology with F-actin rings, and tight junctions after 9 days of culture; cells could phagocytose In vivo: N/A
	Fibrinogen	Human fetal RPE	In vitro: N/A In vivo: cell-seeded fibrinogen matrix in rabbits had photoreceptor loss near transplanted tissue. cell-seeded matrix had minimal choroidal thickening and inflammation
	Gelatin	Porcine RPE sheets	In vitro: N/A In vivo: Subretinal transplants into domestic pigs. Multilayer transplant sheets with outer segment shortening. Cells synthesized basement membrane
	Silk fibroin	ARPE19, human primary RPE	In vitro: cells with characteristic cobblestone morphology after 8 weeks In vivo: N/A
	Cryoprecipitate	Human fetal RPE	In vitro: Hexagonal shape, tight junctions, and clear monolayer seen on fiber scaffolds compared to film or glass; phagocytosis ability seen using latex beads In vivo: N/A
	Bacterial cellulose	h-TERT immortalized RPE	In vitro: Acetylated bacterial cellulose demonstrated higher cell adhesion and proliferation compared to unmodified bacterial cellulose In vivo: N/A
	Synthetic polymers	PLGA	Human primary RPE
Parylene C		ARPE19; ESC-derived RPE	In vitro: cells on Matrigel-coated scaffolds had hexagonal shape, pigmentation, tight cell-cell junctions, apical microvilli after 4 weeks In vivo: cells transplanted on scaffold had higher survival compared to free cells in athymic nude rats. More macrophages with scaffolds present
PLLA/PLGA		Mouse RPC	In vitro: Immature RPC markers expression levels decreased after 7 days of culture In vivo: Estimated >50% survival of grafted cells

Table 1. (Continued)

	Scaffold material	Cell types	In vitro characterization/in vivo results
	PCL	Mouse RPC	In vitro: Increased cell attachment, recoverin, rhodopsin, GFAP upregulation; SOX2 downregulation In vivo: N/A
	PEGDMA	Aged human RPE; porcine RPE	In vitro: Over 90% viability; confluent cells expressed F-actin and tight junction In vivo: N/A
	PTMC	Human ESC-RPE	In vitro: PTMC scaffolds supported the maturation of human ESC-RPE promoting a confluent monolayer of cells and RPE-specific gene expression In vivo: N/A
	PDMS	iPSC-derived RPE	In vitro: PDMS enhanced attachment, proliferation, polarization, and maturation of cells In vivo: Subretinal scaffold implantation in porcine eyes showed biocompatibility and ERG revealed preserved macular function up to 2 years after implantation
Combination scaffolds	Chitosan-PCL/PCL	Mouse RPC	In vitro: Promoted proliferation and differentiation of cells In vivo: N/A
	Silk fibroin, PCL, gelatin	Primary adult human RPE	In vitro: Higher cell growth rate and higher expression of characteristic RPE genes compared to PCL and PCL-silk scaffolds In vivo: Subscleral implantation with no inflammation or rejection

Πίνακας 5: Σύνοψη ικρωμάτων που έχουν χρησιμοποιηθεί για την υποστήριξη των κυττάρων RPE.
(White and Olabisi)

Βέβαια, η μεταμόσχευση 'φύλλου' RPE απαιτεί σημαντικά μεγαλύτερη τομή από αυτήν του εναιωρήματος κυττάρων και είναι μια διαδικασία πιο παρεμβατική, απαιτεί μεγαλύτερο χρόνο αποκατάστασης και μπορεί να δημιουργήσει ουλή στον αμφιβληστροειδή. Τεχνικά εμφανίζει περισσότερες δυσκολίες εφόσον χρειάζεται να διπλωθεί ένα μεγάλο 'φύλλο' RPE 6x3mm σε μέγεθος και να ξεδιπλωθεί στον υπαμφιβληστροειδικό χώρο.

Προκειμένου να επιβιώσει το μόσχευμα θα πρέπει να αποκατασταθεί η χοριοειδική κυκλοφορία και η αιμάτωση του μοσχεύματος. Σε περιπτώσεις εκφύλισης του αμφιβληστροειδούς το RPE και η μεμβράνη του Bruch έχουν υποστεί αλλοιώσεις. Συνεπώς η αποκατάσταση της κυκλοφορίας μπορεί να καταστεί προβληματική. Περαιτέρω έρευνες βρίσκονται σε εξέλιξη για την αιμάτωση του μοσχεύματος. Η OCT αγγειογραφία θα μπορούσε να βοηθήσει προς αυτήν την κατεύθυνση.

Η ανάπτυξη ενός υγιούς αιματοαμφιβληστροειδικού φραγμού είναι απαραίτητη για την μακρόχρονη επιβίωση της κυτταρικής θεραπείας. Ένας βασικός σκόπελος που πρέπει να ξεπεραστεί είναι η φλεγμονή. Ο αμφιβληστροειδής είναι ένας ιστός που εμφανίζει ανοσολογική υπεροχή/ασυλία (immune privilege) αλλά μόνο σε παρουσία υγιούς RPE και μεμβράνης του Bruch. Αντιθέτως στην AMD δεν υπάρχει ανοσολογική ανοχή και παρατηρείται σημαντικού βαθμού διήθηση από μακροφάγα. (White CE and Olabisi RM 2017)

Το ιδανικό λοιπόν ικρίωμα θα πρέπει να παρέχει την καλύτερη δυνατή στήριξη στα κύτταρα προς μεταμόσχευση και να αποκαθιστά τον αιματοαμφιβληστροειδικό φραγμό.

3.13 Κλινικές μελέτες

Μέχρι στιγμής έχουν μεταμοσχευθεί 29 ασθενείς με κύτταρα RPE προερχόμενα από ESCs και μόνο 1 ασθενής με RPE κύτταρα προερχόμενα από iPSCs. Από αυτούς, σε 7 ασθενείς μεταμοσχεύθηκε 'φύλλο' RPE (6 σε συνθετικά ικρίωματα και 1 χωρίς κανένα ικρίωμα) και 22 ασθενείς έλαβαν εναιώρημα RPE (11 με AMD και 11 με νόσο Stargardt). Αν και ο αριθμός των ασθενών είναι πολύ μικρός για να γίνει συγκριτική ανάλυση των δεδομένων από συνολικά 5 κλινικές δοκιμές, η ασφάλεια της μεταμόσχευσης RPE έχει επιβεβαιωθεί από όλες. Δεν παρατηρήθηκαν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες σε κανέναν από τους ασθενείς και οι μόνες ανεπιθύμητες ενέργειες συσχετιζόταν με τους ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες ή τη χειρουργική διαδικασία χορήγησης (Πίνακας 6).

Οι ασθενείς που μελετήθηκαν έπασχαν κυρίως από προχωρημένη εκφύλιση του αμφιβληστροειδούς: 11 ασθενείς με ξηρά AMD, 3 με υγρά AMD και 11 με νόσο του Stargardt. Λόγω του σχεδιασμού των φάσης I μελετών ασφάλειας, οι περισσότεροι ασθενείς είχαν αρκετά χαμηλή όραση. Αρκετοί είχαν μόνο αντίληψη κινουμένης χειρός οπότε δεν αναμένεται ιδιαίτερη βελτίωση της όρασης σε ασθενείς με τόσο χαμηλή οπτική οξύτητα. Κανένας από τους ασθενείς δεν εμφάνισε επιδείνωση της όρασης κατόπιν της μεταμόσχευσης. Από τους 3 ασθενείς με υγρά AMD, κανένας δε χρειάστηκε περαιτέρω θεραπεία με anti-VEGF οπότε πιθανώς τα μεταμοσχευμένα κύτταρα εμπόδισαν τα χοριοειδικά αγγεία να επεκταθούν στον αμφιβληστροειδή. Και οι 2 ασθενείς με υγρά ηλικιακή εκφύλιση που έλαβαν το 'φύλλο' RPE παρουσίασαν σημαντική βελτίωση της όρασης. Με τα τωρινά δεδομένα, δε μπορεί να διευκρινιστεί αν η βελτίωση αυτή οφείλεται στα

μεταμοσχευμένα κύτταρα ή στο ίδιο το χειρουργείο. Από προηγούμενες μελέτες φαίνεται ότι μια χειρουργική

74

επέμβαση που αφαιρεί την αιμορραγία υπαμφιβληστροειδικά, μπορεί να βελτιώσει την όραση του ασθενούς. Σε περίπτωση ξηράς AMD, οποιαδήποτε βελτίωση της όρασης μετά τη μεταμόσχευση, πιθανώς οφείλεται στα μοσχεύματα RPE. (Sharma R et al 2020)

Reference(s)	Patient population	Follow-up	Outcomes	Adverse events
Schwartz et al. (5, 6) Song et al. (7)	Dry AMD: 11 patients (70–88 years), BCVA 20/200 hand motion STGD: 11 patients (20–71 years)	Median 22 months	AMD: median VA increase treated versus untreated eye (14 letters versus 1 letter, $P = 0.0117$) STGD: trend toward improved VA in treated eye (12 letters); no adverse proliferation	One eye developed endophthalmitis One eye developed vitreous inflammation that resolved in 6 months Three eyes developed preretinal patches, noncontractile Four eyes developed cataract
Mandai et al. (10)	One wet AMD patient (77 years) BCVA 20/200 right eye	1 year	No evidence of leakage or recurrence of hemorrhage No need for additional anti-VEGF injections BCVA maintained at 20/200 Fixation shifted closer to the transplant	Choroidal hemorrhage 3 days post transplantation Scaffold curling Cystoid macular edema
Kashani et al. (9)	Dry AMD: 5 patients (69–85 years) Visual acuity on ETDRS chart (range 3–22)	4–12 months	Three patients VA stable One patient showed 17-letter improvement All four patients had ELM detectable by OCT over the area of the transplant Three patients had fixation detected over the transplant	One patient could not be transplanted Mild to moderate surgery-associated hemorrhage was noted in all four patients; it resolved in three without intervention, and one required anti-VEGF injections
da Cruz et al. (8)	Acute wet AMD: 2 patients (60 and 84 years) Visual acuity on ETDRS chart (10 and 8, respectively)	4–12 months	Patient 1 and Patient 2 had 19- and 21-letter improvements, respectively RPE cell migration off the patch Fixation changed to the area of the patch	Exposure of the suture for fluocinolone implant in Patient 1 Worsening of diabetes in Patient 2 PVR with tractional membranes in Patient 2

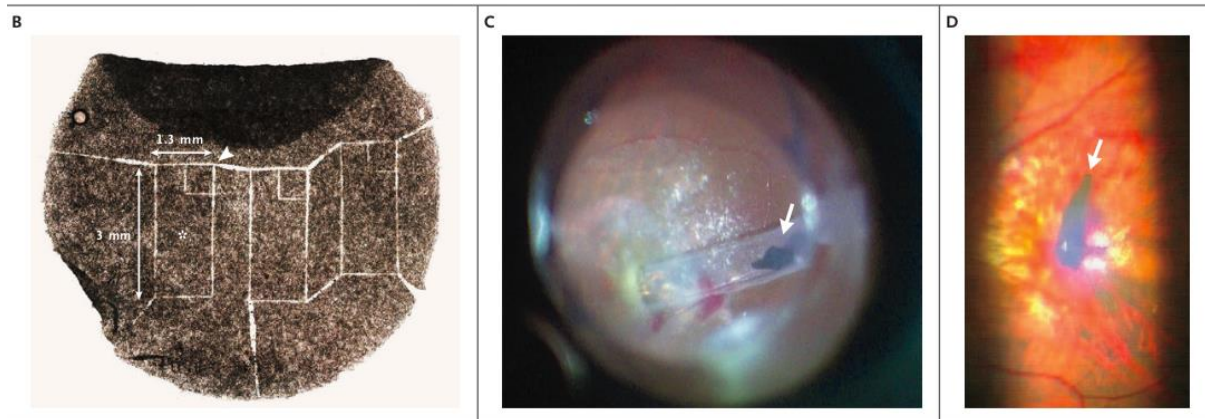
Πίνακας 6: Περίληψη των αποτελεσμάτων κλινικών μελετών μεταμόσχευσης RPE κυττάρων προερχόμενων από iPSCs. (Sharma et al)

Οι Mandai et al. από το κέντρο εξελικτικής βιολογίας Riken της Ιαπωνίας δημοσίευσαν το πρώτο περιστατικό μεταμόσχευσης 'φύλλου' κυττάρων RPE σε ασθενή με AMD προερχόμενα από iPSCs.

Ινοβλάστες δέρματος επαναπρογραμματίστηκαν με επισωματικούς φορείς και κατόπιν διαφοροποιήθηκαν σε κύτταρα RPE. Εφόσον έγινε έλεγχος της διαφοροποίησης των κυττάρων RPE,

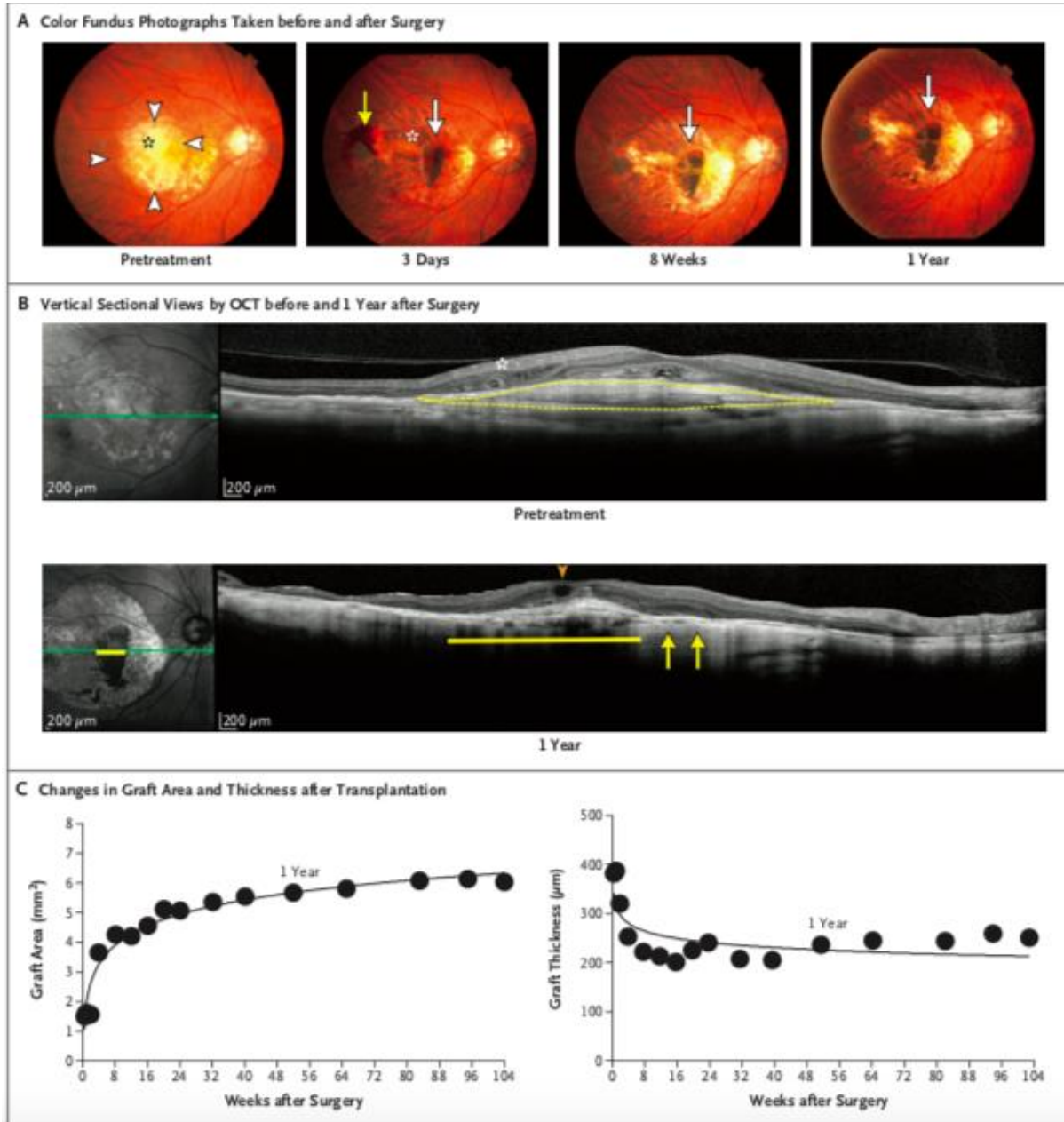
75

ο ασθενής υποβλήθηκε σε χειρουργική επέμβαση. Αρχικά αφαιρέθηκε η νεοαγγειακή μεμβράνη και κατόπιν μεταμοσχεύθηκε το 'φύλλο' του RPE κάτω από τον αμφιβληστροειδή (Εικόνα 58).



Εικόνα 58: Δημιουργία και μεταμόσχευση 'φύλλου' iPSC-RPE. (B) το μέγεθος του φύλλου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1,3X3 mm και ήταν κομμένο στη μια γωνία για να μπορεί να γίνει διάκριση πάνω και κάτω πλευράς (C) το μόσχευμα τοποθετήθηκε υπαμφιβληστροειδικά μέσω ρετινοτομής με μια σύριγγα 1ml συνδεδεμένη με κάννουλα 20 gauge (D) εικόνα του μοσχεύματος (λευκό θέλος) την 1^η μετεγχειρητική ημέρα.

Ένα χρόνο μετά τη μεταμόσχευση, το μεταμοσχευμένο φύλλο παρέμεινε ακέραιο, η οπτική οξύτητα δεν μεταβλήθηκε, και παρατηρήθηκε η παρουσία κυστικού οιδήματος της ωχράς. Ο ασθενής δεν χρειάστηκε να λάβει ανοσοκατασταλτικά και δεν παρατηρήθηκαν σημάδια απόρριψης του μοσχεύματος. Το μόσχευμα που αρχικά ήταν αναδιπλωμένο στα άκρα του, φάνηκε να επιπεδώνεται στις 8 εβδομάδες. Στο 1 έτος, μια στιβάδα κυττάρων RPE παρατηρήθηκε να επεκτείνεται ρινικά της περιοχής του μοσχεύματος (Εικόνα 59). Η μεταμόσχευση των κυττάρων iPSC-RPE φάνηκε να είναι μια ασφαλής διαδικασία. (Mandai M et al 2017)



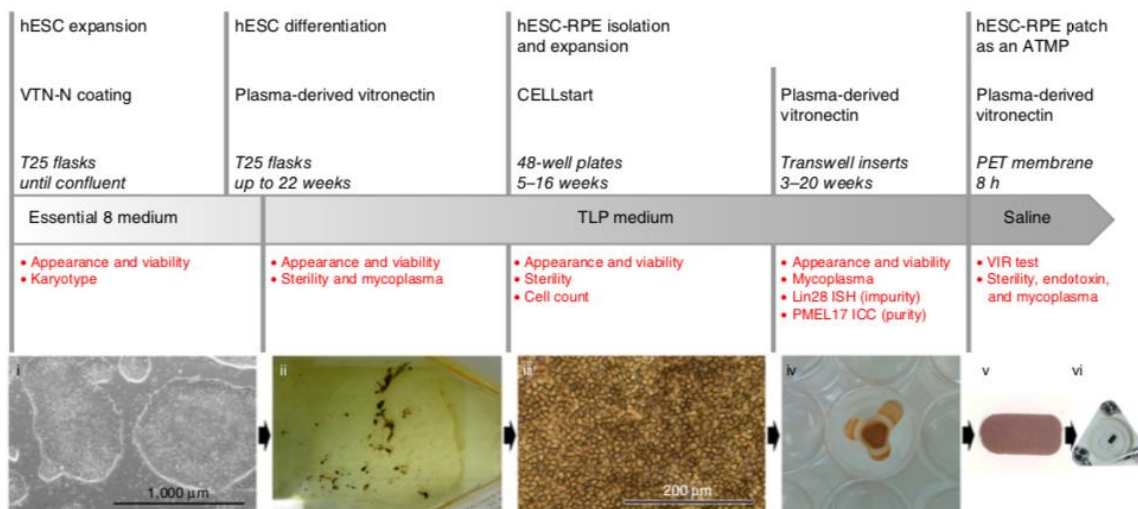
Εικόνα 59: Βυθσκοπικά ευρήματα πριν και μετά το χειρουργείο αφαίρεσης της νεοαγγειακής μεμβράνης και μεταμόσχευσης 'φύλλου' RPE. Μετεγχειρητικές αλλαγές στο εμβαδό και στο πάχος της περιοχής του μωσχεύματος.

Οι da Cruz et al από το Moorfields Eye Hospital και το University College of London (The London Project to Cure Blindness) δημοσίευσαν 2 περιστατικά ασθενών με υγρά AMD και

πρόσφατη οξεία απώλεια όρασης. Η κλινική μελέτη ήταν φάσης I για τη μελέτη της ασφάλειας και της ανεκτικότητας ενός ενθέματος (patch) κυττάρων RPE που προερχόταν από hESCs. Το ένθεμα αποτελούνταν από μια μονή στιβάδα πλήρως διαφοροποιημένων κυττάρων RPE πάνω σε μια

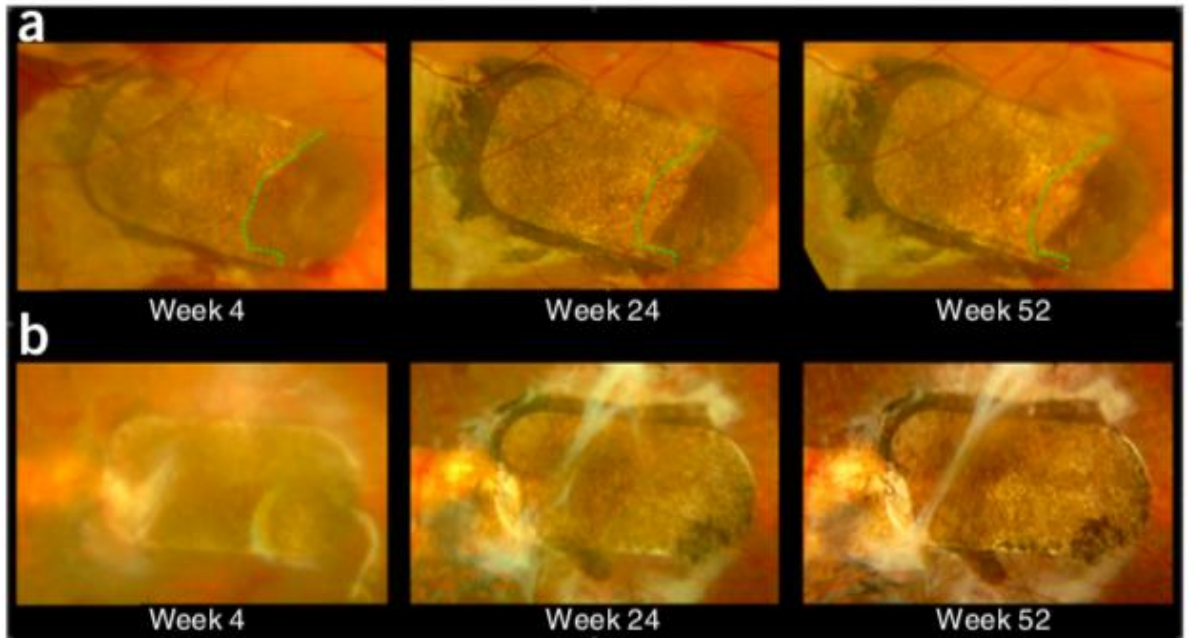
77

συνθετική βασική μεμβράνη από PET (polyethylene terephthalate) και επικαλυμμένη με βιτρονεκτίνη (Εικόνα 60). Το ένθεμα τοποθετήθηκε χειρουργικά υπό τον αμφιβληστροειδή με ειδικά σχεδιασμένο εργαλείο.



Εικόνα 60: Δημιουργία hESC-RPE για τη θεραπεία της AMD. (i) οι αποικίες των hESC επεκτείνονται πάνω σε ανθρώπινη ανασυνδυασμένη βιτρονεκτίνη (ii)Αυτόματη διαφοροποίηση προς κύτταρα RPE που εμφανίζονται σαν διακριτά χρωστικοφόρα νησίδια (iii) Αυτά τα νησίδια διαχωρίζονται χειροκίνητα και φιλτράρονται ώστε να δημιουργηθεί ένας ομοιογενής πληθυσμός από αμιγώς κύτταρα RPE που επιστρώνονται σε τρυβλία και επεκτεινόμενα αποκτούν την κλασική μορφολογία τους σαν πλακόστρωτο (iv) Πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα RPE τοποθετούνται σε διαπερατές μεμβράνες PET επικαλυμένες με ανθρώπινη βιτρονεκτίνη (v) Ένα θεραπευτικό ένθεμα μονοστιβάδας RPE καθηλωμένης πάνω σε PET μεμβράνη επικαλυμμένη με βιτρονεκτίνη που έχει αποκοπεί (vi) το τελικό θεραπευτικό προϊόν παραδίδεται στη χειρουργική ομάδα σε μιας χρήσης αποστειρωμένο περιέκτη με φυσιολογικό ορό όπου είναι βιώσιμο μέχρι 8 ώρες.

Ένα έτος κατόπιν της μεταμόσχευσης, το ένθεμα ήταν καλά ανεκτό και ορατό τόσο βυθοσκοπικά όσο και με τη χρήση OCT και οι ασθενείς εμφάνισαν βελτίωση στην οπτική τους οξύτητα κατά 21 και 29 γράμματα αντιστοίχως (Εικόνα 61). Χρησιμοποιήθηκε μόνο τοπική ανοσοκαταστολή με ενδοϋαλοειδικό ένθεμα φλουοκινολόνης. (da Cruz et al 2018)



Εικόνα 61: Βυθοσκοπική εικόνα του μεταμοσχευμένου ενθέματος στους ασθενείς 1(a) και 2(b). Οι χρωστικοφόρες περιοχές πάνω στο ένθεμα παραμένουν σταθερές ενώ παρατηρείται μια φυγόκεντρος επέκταση χρωστικής στις γύρω περιοχές και έξω από τα όρια του ενθέματος η οποία σταθεροποιείται περί την 24^η εβδομάδα μετά τη μεταμόσχευση.

3.14 Απόρριψη μοσχεύματος

Ο υπαμφιβληστροειδικός χώρος θεωρείται ένας χώρος με σχετική ανοσολογική υπεροχή. Παρ' όλα αυτά, αυτό εξαρτάται από την ακεραιότητα του έξω αιματοαμφιβληστροειδικού φραγμού δηλαδή από την ακεραιότητα του μελαγχρόου επιθηλίου. Στην ξηρά AMD ο φραγμός είναι ακέραιος σε αντίθεση με την υγρά AMD όπου έχει καταρτηθεί. Φαίνεται ότι οι ασθενείς με ξηρά AMD έχουν μικρότερη πιθανότητα για απόρριψη μοσχεύματος σε σχέση με αυτούς που πάσχουν από υγρά AMD.

Η ανάγκη για μακροχρόνια ανοσοκαταστολή στους ανθρώπους θα ήταν μείζων ζήτημα για τον ηλικιωμένο πληθυσμό με AMD που θα λάμβανε αλλογενή μοσχεύματα. Τα αυτόλογα

μοσχεύματα είναι μια λύση αλλά η δημιουργία εξατομικευμένων κυττάρων για κάθε ασθενή θα αποτελούσε χρονοβόρο και δαπανηρό εγχείρημα. Αν και η έκφραση των μορίων MHC είναι

79

χαμηλή σε πολλούς τύπους βλαστικών κυττάρων, οι διαφοροποιημένοι ιστοί εκφράζουν τα μόρια MHC και η έκφραση αυτή προκαλεί ανοσολογική απόρριψη.

Η ελαχιστοποίηση του χειρουργικού τραύματος είναι σημαντική για να μειωθεί η ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας (πχ. κύτταρα φυσικοί φονείς και δενδριτικά κύτταρα) που είναι σημαντική για την απόρριψη του μοσχεύματος. Επίσης, σημαντικό είναι να ελαχιστοποιηθεί η χρήση υλικών ικριωμάτων (scaffold materials) που μπορεί να προκαλέσουν φλεγμονή. Τέλος άλλες πιθανές εναλλακτικές είναι η μείωση της έκφρασης των μορίων MHC στην επιφάνεια των μεταμοσχευμένων κυττάρων μέσω γενετικών χειρισμών (πχ. small-interfering RNAs).

Μια ενθαρρυντική προσέγγιση είναι η δημιουργία τραπεζών RPE κυττάρων προερχόμενων από ESCs ή από iPSCs που είναι HLA (human leukocyte antigen) συμβατά (HLA matched). Τα HLA συμβατά κύτταρα προκαλούν λιγότερη ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων του δότη και καταστέλλουν την απόρριψη. (Chichagova V et al 2018)

3.15 Βλαστικά κύτταρα- Συμπέρασμα

Η ιδέα της αντικατάστασης γερασμένων, εκφυλισμένων ή νεκρών κυττάρων με νέα υγιή κύτταρα είναι ελκυστική και οι πρόσφατες εξελίξεις στο πεδίο της αναγέννησης του αμφιβληστροειδούς ιδιαίτερα ενθαρρυντικές. Βέβαια θα χρειαστεί αρκετός χρόνος μέχρι να αναπτυχθεί μια ασφαλής κυτταρική θεραπεία που θα χρησιμοποιείται ως ρουτίνα σε ασθενείς με τελικού σταδίου AMD. Η τεχνολογία των iPSC και των 3D οργανοειδών αμφιβληστροειδούς αποτελούν μεγάλα άλματα στην αναγέννηση του αμφιβληστροειδούς.

Η καλύτερη πηγή κυττάρων και η κατάλληλη ηλικία των κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν για μεταμόσχευση πρέπει να καθοριστεί. Τα κύτταρα θα πρέπει να παράγονται σε μεγάλους αριθμούς και να απομονώνεται ο επιθυμητός κυτταρικός τύπος προς μεταμόσχευση. Οι μέθοδοι μεταμόσχευσης των κυττάρων χρειάζονται περαιτέρω εξέλιξη. Η μεταμόσχευση

‘φύλλου’ κυττάρων χρειάζεται μεγάλη ρετινοτομή που αυξάνει τον κίνδυνο της παραγωγικής υαλοαμφιβληστροειδοπάθειας (proliferative vitreoretinopathy, PVR) και υπαμφιβληστροειδικής ίνωσης οι οποίες όχι μόνο προκαλούν χειρουργικές επιπλοκές αλλά επηρεάζουν ακόμη και την ενσωμάτωση του μοσχεύματος. Τα εναιωρήματα κυττάρων εμφανίζουν προβλήματα με το

80

θάνατο κυττάρων κατά τη χορήγηση, παλινδρόμηση κυττάρων κατά την έγχυση, ανώμαλη κατανομή κυττάρων μετά την έγχυση και μειωμένη πρόσφυση των κυττάρων RPE. Η ενσωμάτωση και η επιβίωση των μεταμοσχευμένων κυττάρων επίσης χρειάζεται βελτίωση.

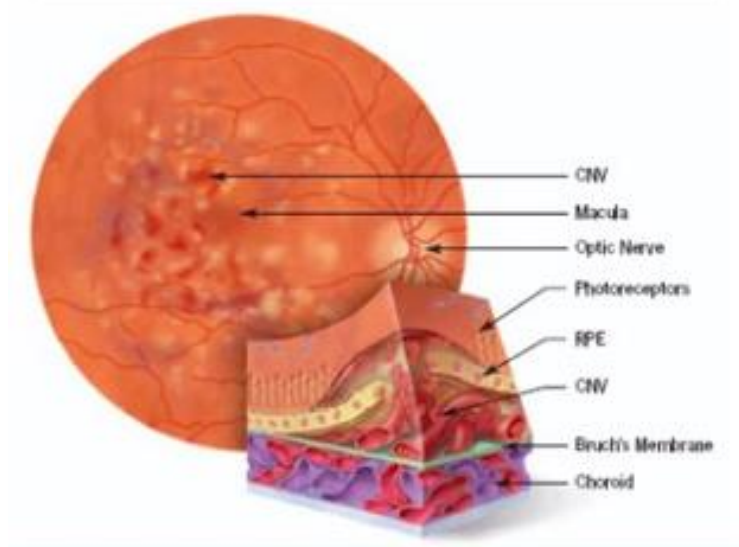
Οι κλινικές μελέτες που έγιναν μέχρι στιγμής αποτέλεσαν τα βασικά και ενθαρρυντικά πρώτα βήματα στη χρήση των βλαστικών κυττάρων για την θεραπεία της AMD. Περαιτέρω μελέτες (εργαστηριακές και κλινικές) είναι απαραίτητες ώστε οι θεραπείες αυτές να αποδειχθούν ασφαλείς και αποτελεσματικές.

4. Η χρήση γονιδιακής θεραπείας για την ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας του αμφιβληστροειδούς.

4.1 Εισαγωγή

Η αγγειογένεση είναι η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων από το προϋπάρχον αγγειακό δίκτυο. Ερεθίσματα όπως η ισχαιμία, η υποξία και η φλεγμονώδης/ανοσολογική απάντηση μπορούν να διαταράξουν την ισορροπία προς όφελος της αγγειογένεσης. Η νεοαγγειακή AMD οφείλεται πρωταρχικά στην διαταραχή της ισορροπίας του VEGF, αν και πληθώρα προαγγειογενετικών και αντιαγγειογενετικών παραγόντων συμμετέχουν στην ομοιόσταση των αγγείων. Τα νεοαγγεία που σχηματίζονται προέρχονται από τον χοριοειδή (choroidal neovascularization, CNV) και στερούνται φυσιολογικής δομής και λειτουργίας οπότε διαρρέουν πλάσμα ή οδηγούν σε αιμορραγία και ίνωση στην περιοχή της ωχράς (Εικόνα 62). Οι ασθενείς που λαμβάνουν αγωγή με anti-VEGF εμφανίζουν σημαντική βελτίωση στην όρασή τους και αυτή είναι πλέον η θεραπεία εκλογής για την υγρού τύπου ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας. Οι anti-VEGF παράγοντες χορηγούνται ενδοϋαλοειδικά και αναστέλλουν την αγγειογένεση συνδεόμενοι απευθείας με τον VEGF ή με τους υποδοχείς του VEGF.

Wet AMD



Εικόνα 62: Σχηματική αναπαράσταση CNV

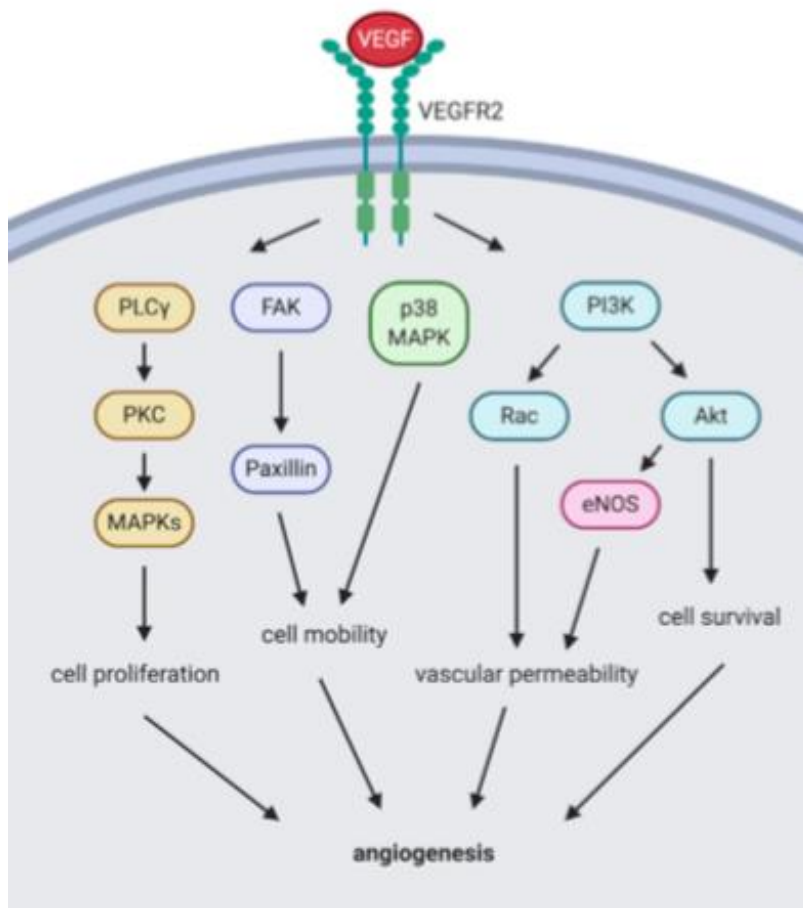
82

Βέβαια το υψηλό κόστος των φαρμάκων, η ανάγκη για συχνή χορήγηση των ενδοϋαλοειδικών ενέσεων, οι επιπλοκές τους, οι μηνιαίες επισκέψεις στις κλινικές και η συχνή απεικόνιση έχουν επιβαρύνει τα συστήματα υγείας αλλά και τους ίδιους τους ασθενείς. Επίσης, τα δεδομένα δείχνουν (real world evidence) ότι η οπτική οξύτητα προοδευτικά μειώνεται σε αυτούς τους ασθενείς παρά το όφελος που είχαν από τις επαναλαμβανόμενες μηνιαίες θεραπείες. Είναι απαραίτητο λοιπόν να αναπτυχθεί μια θεραπεία με παρατεταμένη διάρκεια. (Owen CG et al 2012)

Η γονιδιακή θεραπεία (gene therapy) είναι ειδικά σχεδιασμένη να επιδιορθώνει άμεσα ή να αναπληρώνει ελλειμματικά γονίδια και μπορεί να προσφέρει τη δυνατότητα μιας παρατεταμένης θεραπείας για τους ασθενείς με AMD. Το πρώτο σημαντικό βήμα προς αυτήν την κατεύθυνση ήταν η έγκριση από τον FDA (Food and Drug Administration) του Luxturna (voretigene neparvovec-rzyl) το 2017, της πρώτης γονιδιακής θεραπείας για τις δυστροφίες αμφιβληστροειδούς που προκαλούνται από μετάλλαξη στο γονίδιο RPE65 (Εικόνα 63).

αριθμό σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν τελικά σε αγγειογένεση (Εικόνα 64). Η σύνδεση του VEGF με τον VEGFR2, ενεργοποιεί την κινάση της 3-φωσφατιδυλινοσιτόλης (phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K), την φωσφολιπάση C γ (phospholipase C γ, PLCγ), την κινάση εστιακής πρόσφυσης (Focal Adhesion Kinase, FAK) και την πρωτεϊνική κινάση p38 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK).






Η PI3K με τη σειρά της ενεργοποιεί την AKT και τη Rac με αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης (ευνοεί την επιβίωση) και τη μείωση των κυτταρικών συνδέσεων (αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα) αντιστοίχως. Η PLCγ ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (protein kinase C, PKC) και ακολούθως τον καταρράκτη MAPK που ευνοεί την κυτταρική ανάπτυξη και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού (αυξάνει την κινητικότητα του κυττάρου). Οι FAK και p38MAPK είναι οι βασικοί διαμεσολαβητές της προσκόλλησης και μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων (αυξάνουν την κινητικότητα του κυττάρου). Τα αυξημένα επίπεδα του VEGF έχουν ως αποτέλεσμα την μίτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, την μετανάστευσή τους και τη δημιουργία αποφυάδων και αυλών από νέα αγγεία.



Εικόνα 64: Σηματοδοτικό μονοπάτι VEGF/ VEGFR2 στο ενδοθηλιακό κύτταρο που οδηγεί σε αγγειογένεση. (Lin FL et al)

Στην AMD, κλινικές μελέτες έδειξαν ότι τα επίπεδα του VEGF είναι αυξημένα και γι' αυτό τα φάρμακα εκλογής είναι οι anti-VEGF παράγοντες. Στον Πίνακα 7 φαίνονται τα φάρμακα που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για τη θεραπεία της AMD. Ο χρόνος ημιζωής των ουσιών αυτών είναι σχετικά περιορισμένος και ως συνέπεια οι ασθενείς χρειάζονται επαναλαμβανόμενες θεραπείες ανά 1-2 μήνες.

Η έρευνα σήμερα στρέφεται στην ανάπτυξη θεραπειών παρατεταμένης διάρκειας και ελεγχόμενης αποδέσμευσης anti-VEGF, οπότε η γονιδιακή θεραπεία θα μπορούσε να αποτελέσει μια νέα τέτοια θεραπεία. (Guimaraes TAC et al 2021)

Generic Name	Pegaptanib	Bevacizumab	Ranibizumab	Aflibercept	Brolucizumab
Brand name	Macugen	Avastin	Lucentis	Eylea	Beovu
Targets	only one VEGF-A isoform (VEGF ₁₆₅)	all VEGF-A isoform	all VEGF-A isoform	all VEGF-A/VEGF-B/PlGF isoforms	all VEGF-A isoform
Format	aptamer	full monoclonal antibody	antibody fragment	VEGFR1/2 recombinant fusion protein	single-chain antibody fragment
Function	VEGF inhibitor	anti-VEGF antibody	anti-VEGF antibody	VEGF trap	anti-VEGF antibody
Molecular mass	49 kDa	149 kDa	48 kDa	115 kDa	26 kDa
FDA-approved indications	nAMD	no FDA approval for ophthalmic use	nAMD; DR; DME; macular edema after RVO; mCNV	nAMD; DR; DME; macular edema after RVO	nAMD
Clinical dosage regimen	0.3 mg every 6 weeks ³⁵	1.25 mg every 4 weeks ³⁶	0.5 mg every 4 weeks for nAMD ⁴ or 0.3 mg every 4 weeks for DR or DME ^{37,38}	2.0 mg every 4 weeks for first three injections, then every 8 weeks for nAMD ⁹ or 2.0 mg every 4 weeks for the first five injections, then every 8 weeks for DR or DME ³⁶	6.0 mg every 4 weeks for the first three injections, then every 8–12 weeks ³⁸
Intraocular half-lives	4 days ³⁹	6.7 days ⁴⁰ 4.9 days ⁴⁴	7.19 days ⁴¹ 9 days ⁴⁵	11 days ⁴²	4.3 days ⁴³
Molecular structure					

VEGF, vascular endothelial growth factor; PlGF, placental growth factor; nAMD, neovascular age-related macular degeneration; DR, diabetic retinopathy; DME, diabetic macular edema; mCNV, myopic choroidal neovascularization; RVO, retinal vein occlusion.
⁴May give every 12 weeks after 3 or 4 monthly injections for nAMD, but is less effective than once monthly dosing.
⁹May give every 12 weeks for selected patients after first year.

Πίνακας 7: Σύνοψη διαθέσιμων anti-VEGF θεραπειών (Lin et al)

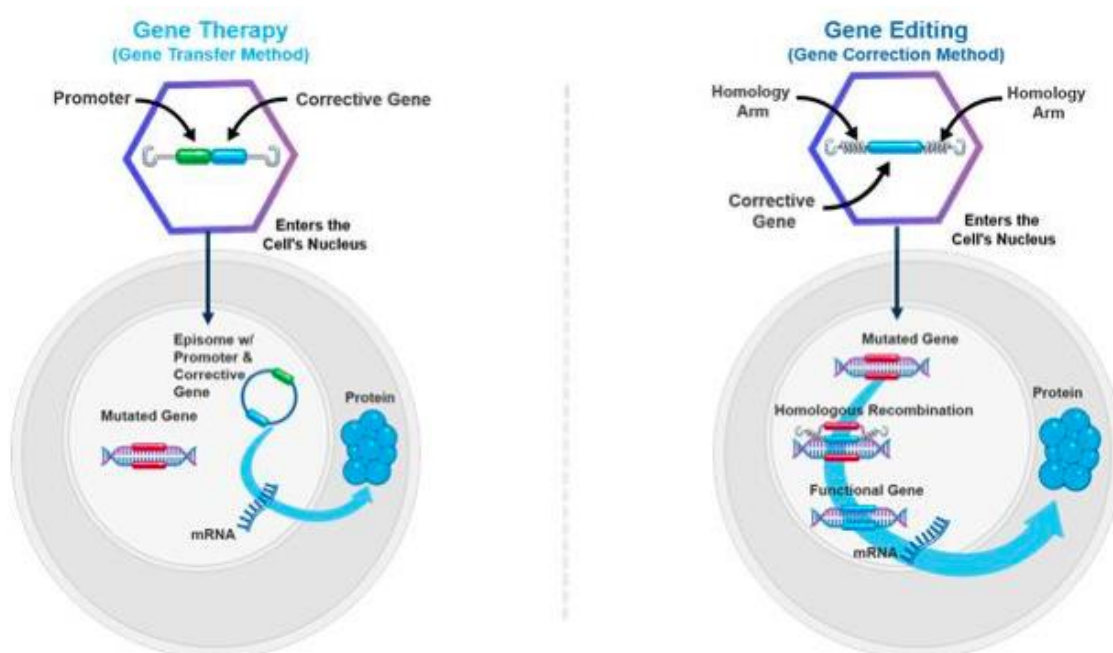
4.3 Πλεονεκτήματα του οφθαλμού για τη χρήση της γονιδιακής θεραπείας

Ο οφθαλμός εμφανίζει πλεονεκτήματα ως όργανο-στόχος για γονιδιακή θεραπεία. Τα κυριότερα από αυτά είναι τα εξής:

- Εύκολη προσβασιμότητα και οπτική διαύγεια ευνοούν την άμεση παρατήρηση της μικροχειρουργικής έγχυσης του γενετικού υλικού στον αμφιβληστροειδή.
- Σχετική ανοσολογική υπεροχή/ασυλία. Ο αιματοαμφιβληστροειδικός φραγμός προσδίδει στον αμφιβληστροειδή μια κατάσταση ανοσολογικής υπεροχής/ασυλίας, εμποδίζοντας την κυκλοφορία κυττάρων του ανοσοποιητικού από τη συστηματική κυκλοφορία στον οφθαλμό. Οι ανοσολογικές απαντήσεις είναι μειωμένες.
- Ο φραγμός επίσης εμποδίζει τη διαρροή του θεραπευτικού γενετικού υλικού στην συστηματική κυκλοφορία και περιορίζει την έκφραση του θεραπευτικού γονιδίου μόνο στον οφθαλμό. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι ο οφθαλμός είναι σχετικά διαμερισματοποιημένος και το γονίδιο εκφράζεται μόνο τοπικά, μικρότερες δόσεις γενετικού υλικού απαιτούνται για τη θεραπεία.
- Τα κύτταρα στόχος της θεραπείας (φωτούποδοχείς και κύτταρα RPE) δε διαιρούνται οπότε η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να έχει παρατεταμένο αποτέλεσμα. (Guimaraes TAC et al 2021)

4.4 Τύποι γονιδιακής θεραπείας

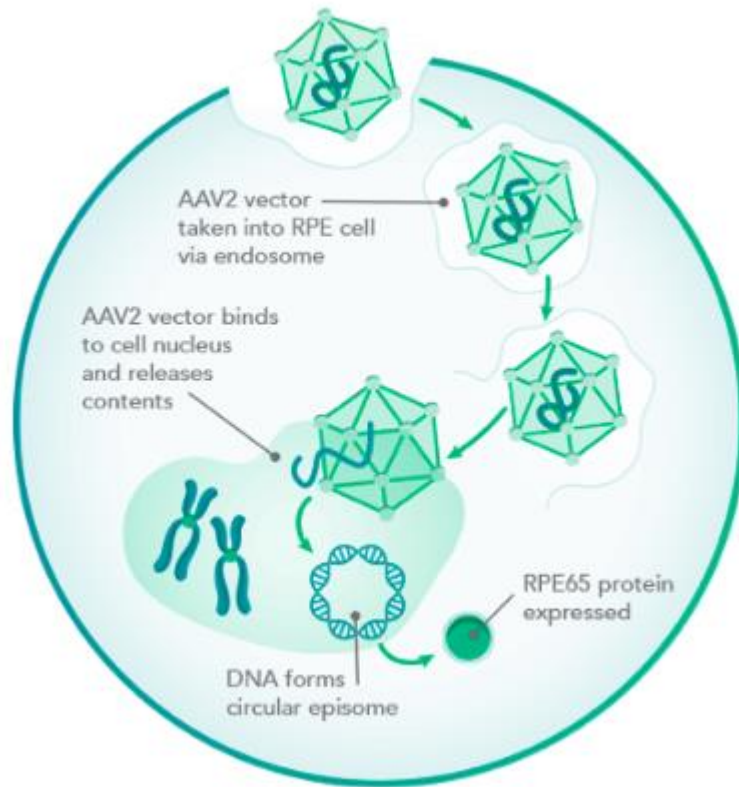
Με τη γονιδιακή θεραπεία εισάγεται εξωγενές γενετικό υλικό όπως DNA, RNA, small interfering RNA (siRNA), microRNA (miRNA) και αντισημείοντα ολιγονουκλεοτίδια (antisense oligonucleotides, συνθετική αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων συμπληρωματική σε mRNA) σε κύτταρα με ικούς ή μη ικούς φορείς ώστε να ρυθμιστούν, να αντικατασταθούν ή να τροποποιηθούν συγκεκριμένες γονιδιακές λειτουργίες. Γενικά η γονιδιακή θεραπεία κατηγοριοποιείται σε γονιδιακή επιμήκυνση (gene augmentation) και γονιδιακή τροποποίηση (gene editing) (Εικόνα 65).



Εικόνα 65: Τύποι γονιδιακής θεραπείας

Με τη **γονιδιακή επιμήκυνση (gene augmentation)** εισάγεται το σωστό αντίγραφο του γονιδίου στο γονιδίωμα του δέκτη ώστε να διορθώσει το ελλειμματικό γονίδιο. Ένα τέτοιο παράδειγμα γονιδιακής θεραπείας αποτελεί το Luxturna. Μεταλλάξεις στο γονίδιο RPE65 απενεργοποιούν τη δραστηριότητα μιας πρωτεΐνης απαραίτητης για την ανακύκλωση της φωτοχρωστικής στον οπτικό κύκλο που οδηγεί σε θάνατο των φωτοϋποδοχέων και τελικώς σε χαμηλή οπτική οξύτητα. Η γονιδιακή επιμήκυνση γίνεται με την εισαγωγή ενός φυσιολογικού αντιγράφου του γονιδίου RPE65 μέσω αδενοϊού (adeno-associated virus, AAV) με έγχυση υπό τον αμφιβληστροειδή (Εικόνα 66). Η μέθοδος της γονιδιακής επιμήκυνσης είναι χρήσιμη για τις κληρονομικές δυστροφίες του αμφιβληστροειδούς όπου οι μεταλλάξεις οδηγούν σε απώλεια της

λειτουργικότητας και ειδικά σε αυτές που κληρονομούνται με τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο και το φυλοσύνδετο χαρακτήρα.



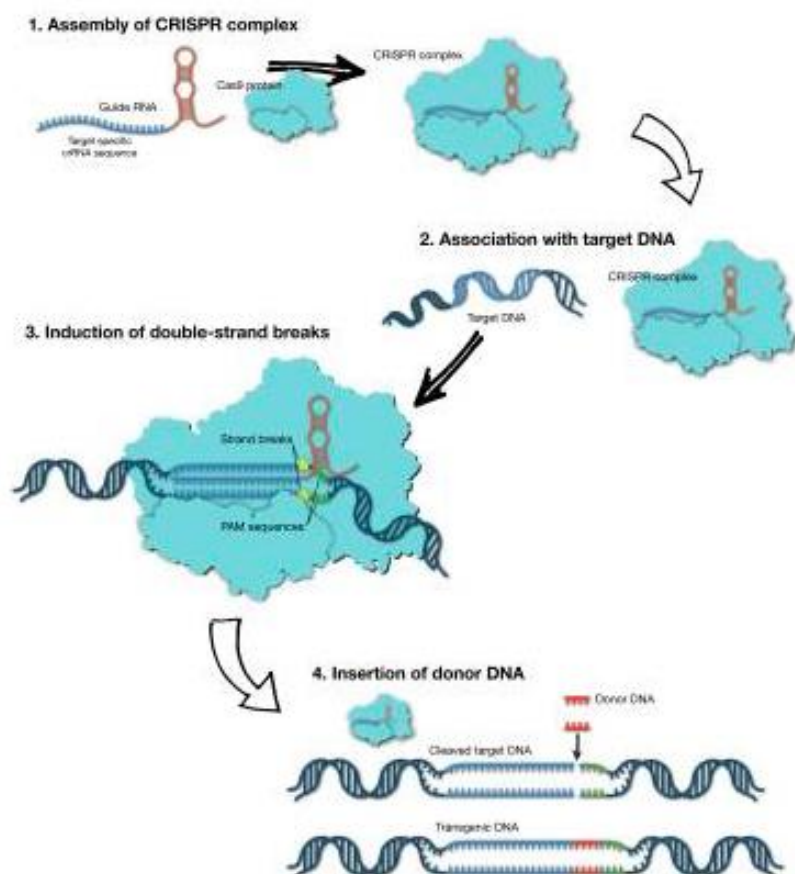
Εικόνα 66: Μηχανισμός δράσης γονιδιακής θεραπείας που στοχεύει το γονίδιο RPE65

Η **γονιδιακή τροποποίηση (gene editing)** είναι μια μέθοδος με την οποία εισάγεται γενετικό υλικό σε ένα κύτταρο/ιστό στόχο ώστε να γίνει στοχευμένη τροποποίηση ή απενεργοποίηση του γονιδίου που προκαλεί νόσο είτε αντικατάστασή του από το φυσιολογικό γονίδιο. Αυτές οι στοχευμένες θεραπείες που τροποποιούν παθολογικά μοριακά μονοπάτια σε επίπεδο γονιδίου φαίνεται να έχουν ένδειξη για τη μακρόχρονη θεραπεία αυτοσωματικών επικρατών κληρονομικών νοσημάτων καθώς και μη γενετικών παθήσεων. Με τη γονιδιακή τροποποίηση το παθολογικό γονίδιο επιδιορθώνεται ενώ με τη γονιδιακή επιμήκυνση απλά προστίθενται φυσιολογικά αντίγραφα του παθολογικού γονιδίου.

Η γονιδιακή τροποποίηση χρησιμοποιεί προγραμματισμένες ενδονουκλεάσες ειδικής θέσης που στοχεύουν σε ειδικούς τόπους και διορθώνουν συγκεκριμένες παθογόνες αλληλουχίες. Έχουν χρησιμοποιηθεί για γονιδιακή τροποποίηση διάφορες ενδονουκλεάσες (μεγανουκλεάσες, zinc finger

νουκλεάσες κτλ) και πιο πρόσφατα το γενετικό 'ψαλίδι' CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-associated Caspase 9) (Εικόνα 67).

Το σύστημα CRISPR-Cas9 διαθέτει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι των άλλων εργαλείων τροποποίησης όπως η ευκολία στο σχεδιασμό του στόχου, ευκολία στην παραγωγή του σε μεγάλη κλίμακα και σχετικά χαμηλό κόστος. Εκτός από την απενεργοποίηση ενός γονιδίου και τη μεταγραφική ρύθμιση, το σύστημα CRISPR-Cas9 μπορεί να τροποποιεί βάσεις τόσο στο DNA όσο και στο RNA, αναγνωρίζοντας και κόβοντας αλληλουχίες RNA χωρίς να αλλάζει η αλληλουχία και η ακεραιότητα του γονιδιακού DNA. Οι γονιδιακές θεραπείες βασιζόμενες στο σύστημα CRISPR-Cas9 αποδεικνύονται ιδιαίτερα ελπιδοφόρες από μελέτες σε ζώα για κληρονομικές δυστροφίες του αμφιβληστροειδούς και επίκτητες παθήσεις όπως η AMD. (Lin FL et al 2020)



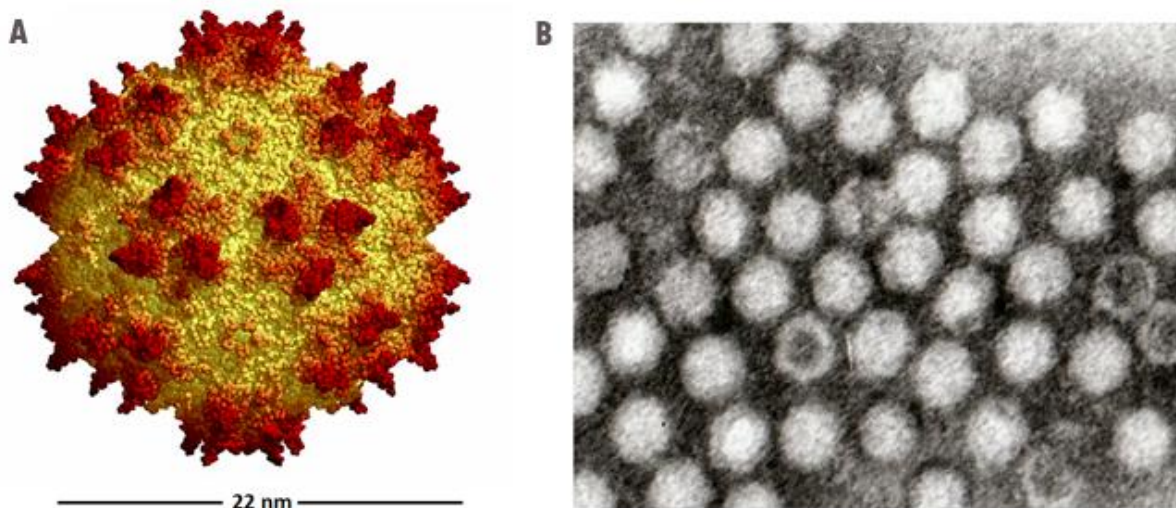
Εικόνα 67: Μηχανισμός της γενετικής τροποποίησης με CRISPR-Cas9. Το σύστημα CRISPR-Cas9 χρειάζεται ένα μονόκλωνο οδηγό RNA (single guide RNA, sgRNA) που οδηγεί την ενδονουκλεάση Cas9 σε μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιακού DNA και κόβουν τη διπλή έλικα. Με την ταυτόχρονη χορήγηση DNA δότη, δημιουργείται διαγονιδιακό DNA ενώ σε απουσία DNA δότη, η ρωγμή στη διπλή έλικα θα επιδιορθωθεί από

το ίδιο το κύτταρο με αποτέλεσμα την προσθήκη ή τη διαγραφή βάσεων και πιθανόν θα επηρεαστεί και το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου.

4.5 Ιικοί φορείς (Viral vectors)

Βασική προϋπόθεση για μια πετυχημένη γονιδιακή θεραπεία είναι ο κατάλληλος φορέας που βοηθά στην έκφραση του γονιδίου σε υψηλά επίπεδα και είναι όσο το δυνατόν λιγότερο τοξικός και ανοσογόνος. Έχουν δοκιμαστεί πολλοί μη ιικοί και ιικοί φορείς αλλά ο πιο κατάλληλος φορέας για την προσθήκη γονιδίων στον αμφιβληστροειδή είναι ο ανασυνδυασμένος ιικός φορέας που σχετίζεται με τον αδενοϊό (adeno-associated viral vector, AAV).

Ο βασικός λόγος επιτυχίας του AAV είναι το μικρό, μονής έλικας DNA γονιδιώμά του περίπου 4.6 κιλοβάσεων (kb) και η οργάνωση του καψιδίου του που διευκολύνει τις γενετικές τροποποιήσεις (Εικόνα 68).



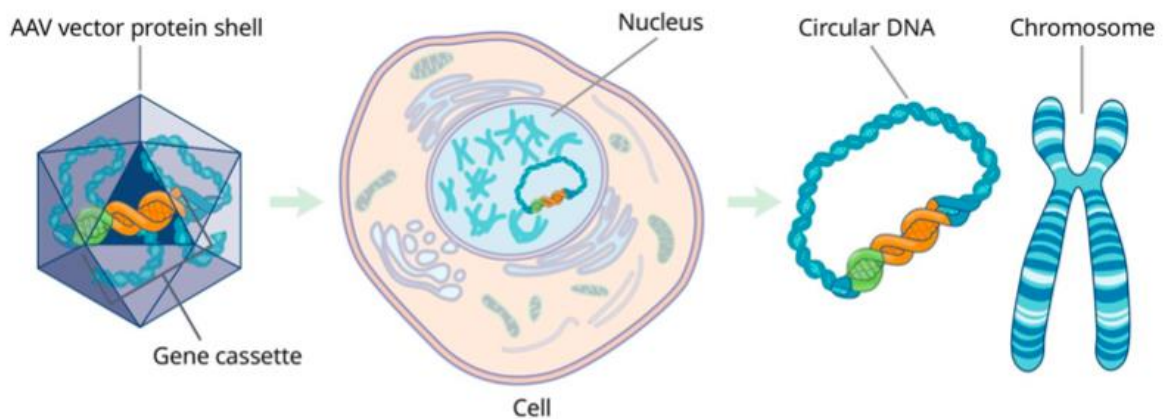
Εικόνα 68: Δομή του Adeno-associated virus (AAV). A. Γραφική αναπαράσταση του μεγέθους και της τρισδιάστατης δομής του AAV. B. Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ικών φορέων AAV.

Οι AAV φορείς που χρησιμοποιούνται για γονιδιακή θεραπεία εισάγονται στο κύτταρο και απελευθερώνουν το γενετικό τους υλικό στον πυρήνα του κυττάρου που σχηματίζει ένα κυκλικό

μόριο DNA το οποίο δεν ενσωματώνεται στα χρωμοσώματα αλλά πολλαπλασιάζεται ανεξάρτητα σαν

90

επίσωμα. Αυτό το κυκλικό μόριο DNA χρησιμεύει σαν μήτρα για την μακρόχρονη παραγωγή της θεραπευτικής πρωτεΐνης (Εικόνα 69).



Εικόνα 69: Μέθοδος παραγωγής του θεραπευτικού μορίου μέσω γονιδιακής θεραπείας με AAV φορείς.

Δεδομένου ότι περίπου 6% απ' όλες τις ανθρώπινες πρωτεΐνες έχουν μια κωδική αλληλουχία μεγαλύτερη των 4kb, αυτή η μικρή δυνατότητα μεταφοράς γενετικού υλικού αποτέλεσε εμπόδιο για την πρώτη γενιά των AAV. Πολλές τεχνικές εφαρμόστηκαν στο να ξεπεραστεί αυτός ο περιορισμός στη μεταφορά γενετικού υλικού όπως για παράδειγμα η δημιουργία διπλών AAV φορέων (πχ. με την ομόλογη επικάλυψη αλληλουχιών). Έχουν ανακαλυφθεί και άλλοι ορότυποι AAV αλλά οι περισσότερο μελετημένοι ορότυποι σε οφθαλμικές γονιδιακές θεραπείες είναι οι AAV2, AAV5 και AAV8.

Ένα από τα μείζονα ζητήματα της γονιδιακής θεραπείας είναι η πιθανή ανοσολογική απόκριση στο καψίδιο του AAV που μπορεί να έχει βλαπτικές συνέπειες στους ιστούς αλλά επίσης και να μετριάσει το θεραπευτικό αποτέλεσμα. Η χορήγηση ιικού φορέα AAV στον άνθρωπο οδηγεί σε ενεργοποίηση αντιγόνο-ειδικών T λεμφοκυττάρων. Ο κίνδυνος είναι περισσότερο αυξημένος την πρώιμη μετεγχειρητική περίοδο. Ποικίλοι ανοσοτροποποιητικοί παραγόντες (στεροειδή και μη στεροειδή), οδοί χορήγησης (τοπική, περιοφθαλμική, ενδοϋαλοειδική, από του στόματος) και

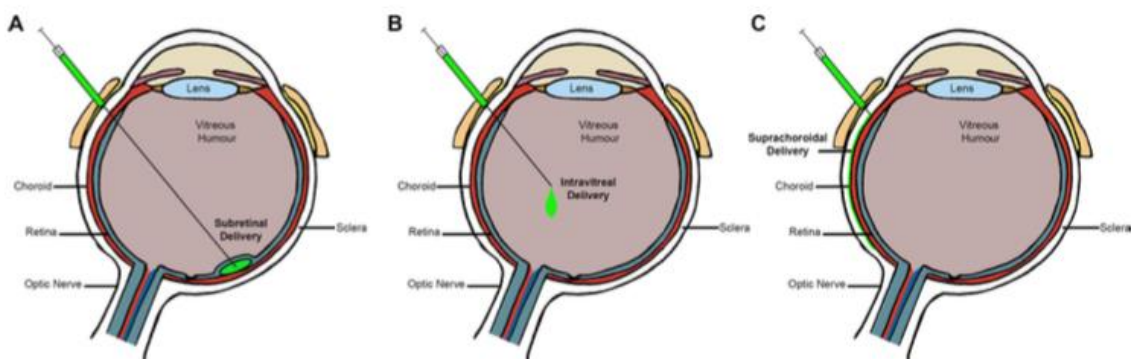
διαφορετική διάρκεια θεραπείας (από ημέρες μέχρι εβδομάδες ή μήνες) έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες οφθαλμικής γονιδιακής θεραπείας με το σκεπτικό ότι μια σχετικά βραχείας διάρκειας ανοσοκαταστολή μετεγχειρητικά θα καταστείλει την ανοσολογική απάντηση μέχρι τα αντιγόνα του

91

καψιδίου να απομακρυνθούν από τα μολυσμένα κύτταρα. Οι μελέτες επίσης έδειξαν ότι υπάρχει ένα δόσοεξαρτώμενο αποτέλεσμα ανάμεσα στη χυμική ανοσία έναντι του καψιδίου του AAV και τη δόση των χορηγούμενων AAV φορέων. Επομένως η μέγιστη δόση ιικών σωματιδίων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί περιορίζεται και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να περιορίσει και το θεραπευτικό αποτέλεσμα. Η εύρεση λοιπόν της κατάλληλης ανοσοτροποποιητικής θεραπείας που θα μειώσει ή ιδανικά θα αναστείλει την ανοσολογική απάντηση είναι μέγιστης σημασίας. Τέλος η οδός χορήγησης του ιικού φορέα συμβάλλει στην ανοσολογική απάντηση, με την υπαμφιβληστροειδική χορήγηση να προξενεί λιγότερη φλεγμονή σε σχέση με την ενδοϋαλοειδική.

Ένα επιπλέον ζήτημα είναι η ηλικία των ασθενών με AMD η οποία είναι προχωρημένη σε σχέση με την πλειονότητα των ασθενών με κληρονομικές δυστροφίες του αμφιβληστροειδούς. Το πλεονέκτημα έγκειται στο ότι οι ανοσολογικές αποκρίσεις είναι μειωμένες στον ηλικιωμένο πληθυσμό σε σχέση με τις νεότερες ηλικίες αλλά το μειονέκτημα είναι ότι οι ηλικιωμένοι είναι περισσότερο εκτεθειμένοι στις παρενέργειες της συστηματικής ανοσοτροποποιητικής θεραπείας και επίσης έχουν συνυπάρχουσες νοσηρότητες που τους καθιστούν ακατάλληλους για γονιδιακή θεραπεία. (Lin FL et al 2020)

4.6 Οδοί χορήγησης του ιικού φορέα



Εικόνα 70: Οδοί χορήγησης γονιδιακής θεραπείας. Σχηματική απεικόνιση του οφθαλμού και των διαφορετικών τεχνικών χορήγησης των ιικών φορέων στον οφθαλμό.

Η οδός χορήγησης έχει καθοριστική σημασία για την αποτελεσματικότητα της γονιδιακής θεραπείας. Η χορήγηση των ιικών φορέων θα πρέπει να γίνεται όσο το δυνατόν πιο κοντά στον ιστό-στόχο. Η εικόνα 70 απεικονίζει τους 3 κύριους τρόπους χορήγησης: υπαμφιβληστροειδική, ενδοϋαλοειδική και υπερχοριοειδική.

Αν και η υπαμφιβληστροειδική χορήγηση είναι πιο περίπλοκη και παρεμβατική, είναι προτιμότερη για νοσήματα που επηρεάζουν τους φωτοϋποδοχείς και το μελάγχρουν επιθήλιο όπως για παράδειγμα οι κληρονομικές δυστροφίες του αμφιβληστροειδούς. Παρόλο που η υπαμφιβληστροειδική χορήγηση σχετίζεται με παροδική αποκόλληση του αμφιβληστροειδούς και προκαλεί μεγαλύτερη βλάβη στους ιστούς από την ενδοϋαλοειδική χορήγηση, τα πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι είναι καλά ανεκτή, ασφαλής και μπορεί να αποφέρει ένα καλό θεραπευτικό αποτέλεσμα. Η ρετινοτομή συνήθως γίνεται στο άνω κροταφικό αγγειακό τόξο και επιτρέπει την έγχυση της φυσαλίδας ομαλά στην περιοχή της ωχράς και να δημιουργήσει μια ρηχή ανύψωσή της.

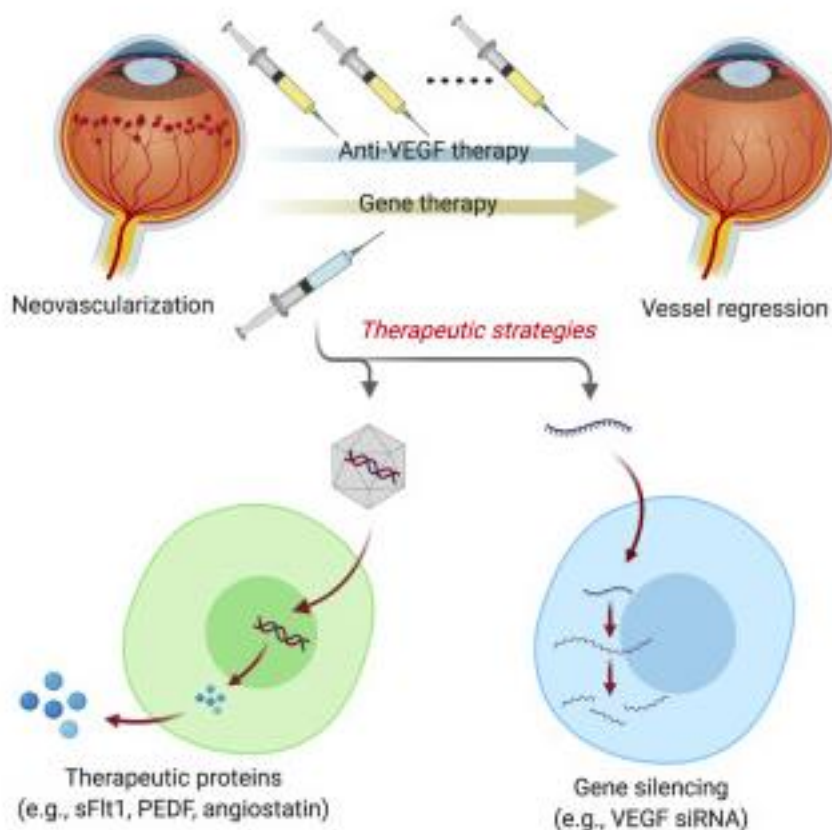
Η ενδοϋαλοειδική χορήγηση αν και είναι λιγότερο παρεμβατική και μπορεί να χορηγηθεί από λιγότερο εξειδικευμένους χειρουργούς, η πλειονότητα των διαθέσιμων AAV φορέων δε μπορούν να φτάσουν στον έξω αμφιβληστροειδή, το RPE και τον χοριοειδή οπότε μειώνεται το θεραπευτικό αποτέλεσμα. Η έσω αφοριστική μεμβράνη (inner limiting membrane, ILM) στην επιφάνεια του αμφιβληστροειδούς δρα σαν φυσικός φραγμός και εμποδίζει την εισχώρηση της γονιδιακής θεραπείας στις στιβάδες του αμφιβληστροειδούς. Οι τροποποιημένοι AAV φορείς (ειδικά οι ορότυποι 2, 8 και 9) φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματικοί στη διείσδυση της ILM. Επίσης σε ζωικά μοντέλα φάνηκε ότι η ενδοϋαλοειδική χορήγηση AAV προκάλεσε ανοσολογική απάντηση εναντίον αντιγόνων του ιικού καψιδίου και εμπόδισε την έκφραση της θεραπευτικής πρωτεΐνης στον 2^ο οφθαλμό σε αντίθεση με την υπαμφιβληστροειδική χορήγηση. Φαίνεται ότι η ενδοϋαλοειδική χορήγηση προκαλεί περισσότερη φλεγμονή από την υπαμφιβληστροειδική.

Η υπερχοριοειδική χορήγηση αποτελεί μια ελκυστική οδό χορήγησης φαρμάκων για την AMD και άλλες παθήσεις του χοριοειδούς. Η χορήγηση με υπερχοριοειδική έγχυση βοηθά στην πιο οπίσθια και κυκλοτερή κατανομή της γονιδιακής θεραπείας. Σε μελέτες σε ζώα, η χορήγηση ιικού φορέα AAV8 με μικροκαθετήρα στον υπερχοριοειδικό χώρο οδήγησε σε εκτεταμένη έκφραση του γονιδίου στους φωτοϋποδοχείς και στο RPE. (Guimaraes TAC et al 2021)

4.7 Γονιδιακές θεραπείες για την AMD

Η σημαντική πρόοδος που επετεύχθη στον τομέα της γονιδιακής θεραπείας οδήγησε στην εφαρμογή της θεραπείας αυτής για την AMD. Η γονιδιακή θεραπεία αποτελεί ιδιαίτερα ελκυστική επιλογή διότι έχει τη δυνατότητα να παρέχει μακρόχρονη αποτελεσματικότητα, μειώνοντας έτσι την ανάγκη για επαναλαμβανόμενες εγχύσεις anti-VEGF. Οι τρέχουσες κλινικές μελέτες γονιδιακής θεραπείας για την AMD χρησιμοποιούν 2 κύριες στρατηγικές χορήγησης ενδοφθαλμίως:

- Ικτών φορέων που κωδικοποιούν αντιαγγειογενετικές πρωτεΐνες
- Μόρια μη κωδικού RNA (siRNA) που στοχεύουν στην καταστολή της υπερέκφρασης του VEGF (Εικόνα 71).



Εικόνα 71: Στρατηγικές γονιδιακής θεραπείας για την AMD.

A. Γονιδιακή Θεραπεία με Αντιαγγειογενετικές/Αγγειοστατικές πρωτεΐνες

Με την γονιδιακή θεραπεία υπάρχει η δυνατότητα συνεχούς έκφρασης θεραπευτικών επιπέδων αγγειοστατικών πρωτεϊνών. Στον Πίνακα 8 συνοψίζονται όλες οι κλινικές μελέτες γονιδιακής θεραπείας για την AMD που έχουν γίνει μέχρι σήμερα. (Lin et al 2020)

- **Pigment Epithelial derived factor (PEDF)**

Η ενδοϋαλοειδική χορήγηση ενός διαγονιδιακού φορέα AAV5 που μεταφέρει το γονίδιο του PEDF κατέδειξε σημαντική υποστρόφη της χοριοειδικής νεοαγγείωσης σε ζωικά μοντέλα. Αυτή η μελέτη οδήγησε σε μία από τις πρώτες μελέτες φάσης 1 γονιδιακής θεραπείας για την AMD με ενδοϋαλοειδική χορήγηση AdPEDF.11. Το προϊόν της γονιδιακής θεραπείας φάνηκε να είναι ασφαλές και καλά ανεκτό αλλά η αποτελεσματικότητά του δεν μπορούσε να αξιολογηθεί λόγω της απουσίας ομάδας ελέγχου.

Table 2. Clinical Trials Investigating Human Gene Therapy for Ocular Angiogenesis Diseases Based on Viral Vectors Encoding Antiangiogenic Proteins

Conditions	Identifier: ClinicalTrials.gov	Development Status	Drug	Vector	Mechanism	Route	Company	Study Start Date	Outcome
nAMD	NCT03999801	prospective, observational study; enrolling by invitation	RGX-314	AAV8	encoding for anti-VEGF monoclonal antibody fragment	subretinal	REGENXBIO	May 2019	a long-term follow-up study for RGX-314; no study results posted.
nAMD	NCT03585556	phase I: active, not recruiting	HMR59	AAV2	encoding for sCD59	IVT	Hemera Biosciences	July 2018	evaluated the efficacy and safety of HMR59 with anti-VEGF treatment in nAMD; no study results posted
nAMD	NCT03748784	phase I: recruiting	ADVM-022	AAV2.7m8	encoding for a fibrocept	IVT	Adverum Biotechnologies	November 2018	32-week data showed a maintenance of VA with an improvement of retina structural parameters; no rescue injections were needed to control AMD disease activity (S. Kiss, 2019, Amer. Acad. Ophthalmol. conference; S. Kiss, 2019, Eur. Soc. Gene Cell. Ther., conference)
nAMD	NCT03066258	phase I/IIa: active, not recruiting	RGX-314	AAV8	encoding for anti-VEGF monoclonal antibody fragment	subretinal	REGENXBIO	March 2017	improvement both in VA and retina structural parameters was noted; most patients remained rescue injection-free ¹⁵⁵
nAMD	NCT01678872	phase I: active, not recruiting	RetinoStat	lenti-EIAV	encoding for endostatin and angiostatin	subretinal	Oxford Biomedica	August 2012	a follow-up study to evaluate the safety of RetinoStat; no study results posted
nAMD	NCT01494805	phase I/II: completed	rAAV-sFlt-1	rAAV	encoding for VEGF-neutralizing protein sFLT-1	subretinal	Avalanche Biotechnologies	December 2011	rAAV-sFLT-1 was safe and well tolerated; none of the exploratory endpoints (anti-VEGF retreatment injections, BCVA, and CPT) were statistically significant when rAAV-sFLT-1 was administered alone ^{156,157}
nAMD	NCT01301443	phase I: completed	RetinoStat	lenti-EIAV	encoding for endostatin and angiostatin	subretinal	Oxford Biomedica	February 2011	EIAV vectors provide a safe platform with robust and sustained transgene expression; no significant change in mean lesion size ¹⁵⁸
nAMD	NCT01024998	phase I: completed	AAV2-sFLT01	AAV2	encoding for VEGF-neutralizing protein sFLT01	IVT	Genzyme (Sanofi)	January 2010	AAV2-sFLT01 was safe and well tolerated; further studies are required to identify sources of variability in expression and anti-permeability activity ¹⁵⁹
nAMD	NCT00109499	phase I: completed	AdGVPEDF.11D	adenovirus	encoding for PEDF	IVT	GenVec	April 2005	no serious adverse events were related to AdGVPEDF.11; a possible dose-escalation response was reported ¹⁶⁰

nAMD, neovascular age-related macular degeneration; AAV, adeno-associated virus; LTFU, long-term follow-up; IVT, intravitreal injection; VA, visual acuity; PEDF, pigment epithelium-derived factor.

- **sFLT-1**

Το μόριο sFLT-1 είναι ένας ισχυρός ενδογενής αναστολέας του VEGF-A. Μια μελέτη φάσης 1 με εφάπαξ υπαμφιβληστροειδική χορήγηση του rAAV.sFLT-1 είναι ασφαλής, χωρίς σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες. Αν και η βελτίωση στην οπτική οξύτητα δεν ήταν σημαντική, άνοιξε το δρόμο για την περαιτέρω μελέτη της γονιδιακής θεραπείας ως μια δυνητικά μακροχρόνιας θεραπείας για την AMD.

Μια άλλη μελέτη φάσης 1 αξιολόγησε το προφίλ ασφάλειας της ενδοϋαλοειδικής έγχυσης AAV2-sFLT-1 σε ασθενείς με προχωρημένη AMD. Η έγχυση ήταν καλά ανεκτή σε όλες τις μελετούμενες δόσεις, με μόνο 1 ασθενή που έλαβε την υψηλότερη δόση να εμφανίζει παροδική ενδοφθάλμια φλεγμονή. Η βελτίωση της οπτικής οξύτητας ήταν περιορισμένη λόγω προϋπάρχουσας υπαμφιβληστροειδικής ουλής.

- **Aflibercept**

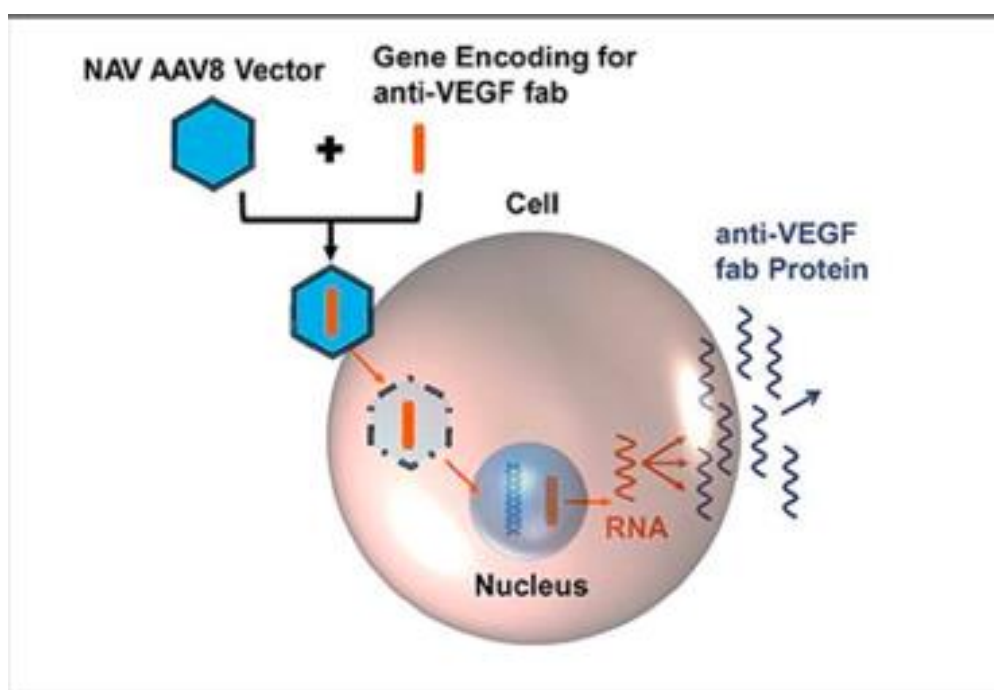
Παρομοίως μελέτη φάσης 1 κατέληξε ότι η ενδοϋαλοειδική έγχυση ιικού φορέα AAV2.7m8-aflibercept σε 6 ασθενείς με AMD είναι ασφαλής και γίνεται καλά ανεκτή. Οι πλειονότητα των ανεπιθύμητων ενεργειών αφορούσαν ήπια φλεγμονή η οποία αντιμετωπιζόταν επαρκώς μόνο με τοπικά στεροειδή. Κατόπιν 34 εβδομάδων, η μείωση του πάχους της ωχράς παρέμενε σταθερή και δε χρειάστηκαν επιπλέον ενέσεις anti-VEGF παραγόντων.

- **Ranibizumab-like**

Ο RGX-314 είναι ένας ανασυνδυασμένος AAV8 φορέας που φέρει μια κωδική αλληλουχία για μία διαλυτή anti-VEGF πρωτεΐνη που μοιάζει με το ranibizumab (Εικόνα 72). Η Regenxbio διεξάγει μια κλινική μελέτη φάσης 1,2 για την εκτίμηση της ασφάλειας και της ανεκτικότητας της υπαμφιβληστροειδικής χορήγησης του RGX-314 σε 42 ασθενείς με AMD που προηγουμένως έλαβαν οποιοδήποτε anti-VEGF φάρμακο. Το 73% των ασθενών παρέμενε ελεύθερο ενέσεων για 6 μήνες το οποίο σχετιζόταν με βελτίωση στην οπτική οξύτητα και στο πάχος του αμφιβληστροειδούς. Μετά από 1,5 χρόνο, το 50% των ασθενών ήταν ελεύθερο ενέσεων και διατηρούσε τη βελτίωση της οπτικής οξύτητας. Το RGX-314 ήταν καλά ανεκτό σε όλες τις μελετούμενες δόσεις.

- **Αγγειοστατίνη και ενδοστατίνη**

Ο RetinoStat είναι ένας μικρός φορέας φακοϊού (lentivirus) που εκφράζει αγγειοστατίνη και ενδοστατίνη οι οποίες είναι αναστολείς της αγγειογένεσης. Μια μελέτη φάσης 1 που περιέλαβε 21 ασθενείς με AMD απέδειξε ότι η υπαμφιβληστροειδική έγχυση του RetinoStat είναι ασφαλής, καλά ανεκτή και οδηγεί σε διαγονιδιακή έκφραση πρωτεϊνών που εξουδετερώνουν τον VEGF.



Εικόνα 72: Ο RGX-314 αποτελείται από έναν μικρό φορέα AAV8 που φέρει ένα γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί ένα τμήμα μονοκλωνικού αντισώματος που προσδένεται στον υποδοχέα του VEGF-A.

- **Καταρράκτης συμπληρώματος**

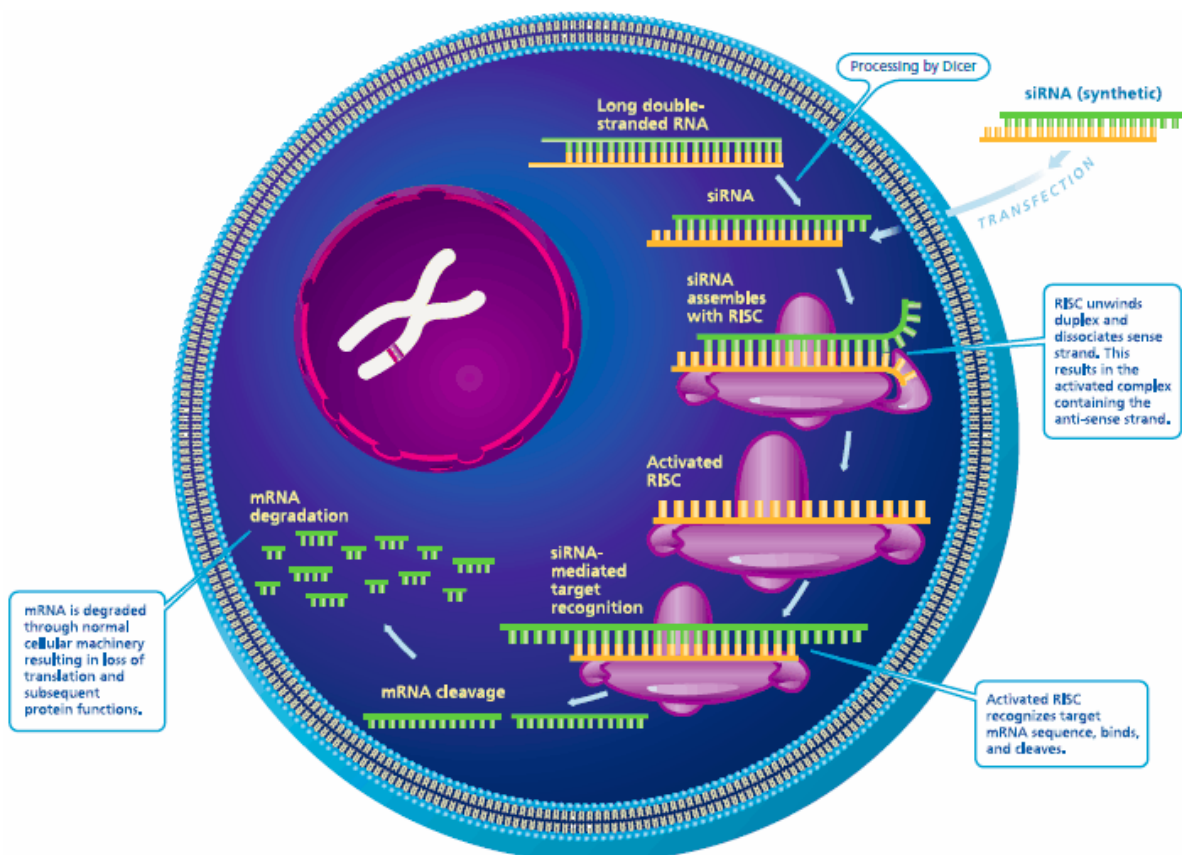
Πρόσφατα δεδομένα συνδέουν την υπερβολική ενεργοποίηση του καταρράκτη του συμπληρώματος με την εκδήλωση AMD. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος οδηγεί στη συσσώρευση του MAC (membrane attack complex) στην επιφάνεια των κυττάρων και οδηγεί σε κυτταρική βλάβη και θάνατο. Μεγάλες ποσότητες του MAC έχουν ανιχνευθεί στα χοριοτριχοειδή

και στο RPE ασθενών με AMD. Το CD59 είναι ένας φυσικός αναστολέας του MAC. Η Hemera Biosciences ξεκίνησε 2 κλινικές μελέτες φάσης 1 για την ενδοϋαλοειδική χορήγηση AAVCAGsCD59 για την ξηρά

97

και υγρά AMD. Το μόριο αυτό στοχεύει στο τελικό στάδιο της ενεργοποίησης του συμπληρώματος που οδηγεί στο σχηματισμό του MAC. Τα αποτελέσματα της μελέτης δεν έχουν γίνει ακόμη γνωστά.

B. Γονιδιακή αποσιώπηση μέσω παρέμβασης RNA (RNA Interference)



Εικόνα 73: Βιολογικός μηχανισμός της παρεμβολής RNA. Το συνθετικό siRNA εισάγεται στο κύτταρο, συνδέεται με το σύμπλοκο RISC, ενεργοποιείται και κατόπιν αναγνωρίζει το mRNA στόχο και το κόβει. Το mRNA κατόπιν αποδομείται από τους κυτταρικούς μηχανισμούς.

Το συνθετικό siRNA αποτελείται συνήθως από 19-22 ζεύγη βάσεων και μπορεί εκλεκτικά να σχηματίζει σύμπλοκο με το συμπληρωματικό του mRNA (Εικόνα 73). Η μετα-μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση με siRNA που στοχεύουν τον VEGF και τον υποδοχέα του φάνηκε

αποτελεσματική στο να μειώνουν την αγγειογένεση σε πειραματικά μοντέλα AMD. Μέχρι στιγμής έχουν γίνει κλινικές μελέτες για 2 τέτοια μόρια siRNA έναντι του VEGF: το bevasiranib και το AGN 211745 (Πίνακας 9).

Το bevasiranib είναι ένα σύμπλοκο από 2 μόρια RNA 21 νουκλεοτιδίων που εκλεκτικά αποσιωπούν το mRNA του VEGF. Ήταν η πρώτη κλινική μελέτη που εγκρίθηκε για τη θεραπεία της AMD μέσω της ενδοϋαλοειδικής χορήγησης bevasiranib. Τα στοιχεία ασφάλειας από την μελέτη φάσης 1 ήταν ενθαρρυντικά αλλά στη μελέτη φάσης 2 η μονοθεραπεία με bevasiranib δεν φάνηκε να είναι αποτελεσματική. Το bevasiranib αναστέλλει μόνο τη σύνθεση νέου VEGF, χωρίς να επηρεάζει τα υπάρχοντα επίπεδα VEGF. Σχεδιάστηκε λοιπόν μια μελέτη φάσης 3 για την αξιολόγηση της συνδυαστικής θεραπείας bevasiranib και ranibizumab σε ασθενείς με AMD. Η μελέτη αυτή αποσύρθηκε κατόπιν της ανακάλυψης ότι η καταστολή της αγγειογένεσης με μόρια siRNA όπως το bevasiranib μπορούν να δρουν περισσότερο μέσω της μη εκλεκτικής ενεργοποίησης του Toll-like receptor (TLR3) και όχι λόγω της συμπληρωματικότητας του siRNA. Επιπλέον το μόριο βρέθηκε ότι προκαλούσε απόπτωση στα κύτταρα του μελαγχρόου επιθηλίου του ποντικού.

Table I siRNA drugs used for AMD.

Drugs	Company	Conditions	NCT Number	Phase	Status	Target	Method of delivery
Bevasiranib	Opko Health	AMD	NCT00722384	I	Completed	VEGF-A	Intravitreal
			NCT00557791	III	Withdrawn		
			NCT00499590	III	Discontinued		
			NCT00259753	II	Completed		
AGN211745 (formerly Sirna-027)	Allergan	AMD	NCT00363714	I/II	Completed	VEGFR-1	Intravitreal
PF-04523655	Quark/ Pfizer	AMD	NCT00725686	I	Completed	RTP801	Intravitreal
			NCT00713518	II	Completed		

Πίνακας 9: Μόρια siRNA που έχουν χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία της AMD.

Το μόριο AGN 211745 είναι ένα διπλό μόριο RNA μήκους 21 νουκλεοτιδίων που έχει σχεδιαστεί για να στοχεύει το mRNA του VEGFR (FLT-1). Παρά τα αρχικά ενθαρρυντικά αποτελέσματα από τη μελέτη φάσης 1, η μελέτη φάσης 2 σταμάτησε λόγω μικρής αποτελεσματικότητας και λόγω αμφιβολίας για πιθανή γενικευμένη εμπλοκή του TLR3.

Η Quark Pharmaceuticals ανέπτυξε το PF-04523655 που στοχεύει στο γονίδιο RTP801 η έκφραση του οποίου επάγεται σε υποξία. Το PF-04523655 είναι ένα siRNA μήκους 19

νουκλεοτιδίων με 2'-Ο-μεθυλίωση σε κάθε ζεύγος ολογονουκλεοτιδίων και έχει δοκιμαστεί σε κλινικές μελέτες για τη θεραπεία της AMD μόνο του ή σε συνδυασμό με ranibizumab. Η μελέτη φάσης 1 απέδειξε ότι η ενδοϋαλοειδική έγχυση του PF-04523655 είναι ασφαλής και καλά ανεκτή αλλά στη μελέτη φάσης 2 η μονοθεραπεία με PF-04523655 δεν βελτίωνε την οπτική οξύτητα σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία

99

με ranibizumab. Υπάρχει πιθανώς ένα συνεργιστικό θεραπευτικό αποτέλεσμα στην οπτική οξύτητα όταν το PF-04523655 συνδυαστεί με ranibizumab.

Αν και οι θεραπείες με siRNA έδειξαν κάποιο όφελος στη θεραπεία ασθενών με AMD, δεν πλεονεκτούν όμως στην αποτελεσματικότητά τους έναντι των κλασικών anti-VEGF θεραπειών και επιπλέον απαιτούνται επαναλαμβανόμενες εγχύσεις του siRNA. Η επίδραση της γονιδιακής αποσιώπησης του siRNA είναι παροδική, τυπικά αποτελεσματική μόνο για 3-7 ημέρες, καθώς τα siRNA αποδομούνται από τις νουκλεάσες του κυττάρου. Παρόλα αυτά, παρατεταμένο θεραπευτικό αποτέλεσμα μπορεί να επιτευχθεί είτε με χημικές τροποποιήσεις των siRNA είτε με τη χρήση ιικών φορέων που υποστηρίζουν την μακρόχρονη αποτελεσματικότητα των θεραπειών που βασίζονται στην παρεμβολή RNA. (Jiang J et al 2021)

Γ. Προκλινικές μελέτες γονιδιακής τροποποίησης με CRISPR-Cas για τη θεραπεία της οφθαλμικής αγγειογένεσης

Υπάρχουν πάνω από 20 κλινικές μελέτες που ερευνούν τα θεραπευτικά αποτελέσματα της χρήσης του συστήματος CRISPR-Cas σε διάφορα νοσήματα όπως ο καρκίνος και η θαλασσαιμία. Πρόσφατα εγκρίθηκε η πρώτη κλινική μελέτη φάσης 1,2 από τον FDA για την αξιολόγηση του AGN-151587, γονιδιακής τροποποίησης βασιζόμενης στο σύστημα CRISPR-Cas σε ασθενείς με συγγενή αμαύρωση του Leber (η πιο συχνή αιτία κληρονομικής τύφλωσης στα παιδιά). Η πάθηση αυτή προκαλείται από συγκεκριμένη γονιδιακή μετάλλαξη. Προς το παρόν για την AMD, η οποία είναι πιο σύνθετη νόσος με πολλούς παράγοντες κινδύνου, υπάρχουν αρκετές προκλινικές μελέτες που ερευνούν τη χρήση του συστήματος CRISPR-Cas και συνοψίζονται στον Πίνακα 10.

Η Cas9 του *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) είναι μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ενδονουκλεάσες και η πρώτη που εφαρμόστηκε σε ανθρώπινα κύτταρα. Σε

προκλινικές μελέτες έχει χρησιμοποιηθεί το σύστημα CRISPR-SpCas9 με ιικό φορέα AAV για την απενεργοποίηση του γονιδίου του VEGFR2 ή του VEGF-A και έχει καταδειχθεί σε άλλοτε άλλο βαθμό η υποστροφή της χοριοειδικής νεοαγγείωσης που έχει προκληθεί κατόπιν εγκαύματος με laser σε πειραματόζωα.

Η μεταφορά του συστήματος CRISPR-Cas μέσω ιικών φορέων AAV φαίνεται να είναι πιο ασφαλής, αποτελεσματική και ακριβής για τη γενετική τροποποίηση γονιδίων που εκφράζονται στον αμφιβληστροειδή. Όμως η σχετικά μικρή χωρητικότητα των AAV φορέων (περίπου 4.7 kb) σημαίνει ότι το γονίδιο της πιο συχνά χρησιμοποιούμενης SpCas9 (περίπου 4.10 kb) καθώς και οι αλληλουχίες του οδηγού gRNA δεν χωρούν στον ίδιο AAV φορέα. Οι φακοϊοί έχουν μεγαλύτερη χωρητικότητα (8-10 kb) αλλά μικρότερη δυνατότητα στο να εισχωρήσουν στον έξω αμφιβληστροειδή.

Table 4. Preclinical Genome Surgery with CRISPR-Cas to Treat Ocular Angiogenesis

Target Gene	Experiment		Specific Nuclease	Delivery Method	Outcome	References
	<i>In Vivo</i>	<i>In Vitro</i>				
<i>VEGF-A</i>		human ARPE-19 cell line	SpCas9	lentivirus (single vector)	CRISPR-Cas9 reduced VEGF-A secretion from human RPE cells and suppressed angiogenesis	199
<i>VEGFR2</i>		primary human retinal microvascular endothelial cell (HREC)	SpCas9	rAAV5 (dual vector)	CRISPR-Cas9-mediated depletion of <i>VEGFR2</i> prevented VEGF-induced Akt activation, as well as proliferation, migration, and tube formation in HRECs	131
<i>VEGFR2</i>		primary human retinal microvascular endothelial cell (HREC)	SpCas9	lentivirus (single vector)	CRISPR-Cas9 decreased VEGF-induced Akt activation, as well as proliferation, tube formation, and migration in <i>VEGFR2</i> -depleted HRECs, and did so to a greater extent than ranibizumab and aflibercept	200
<i>VEGFR2</i>	oxygen-induced retinopathy and laser-induced CNV	C57BL/6 mouse primary brain microvascular endothelial cell (MVEC)	SpCas9	rAAV1 (dual vector)	CRISPR-Cas9-edited MVECs significantly reduced VEGFR2 production <i>in vitro</i> ; intravitreal administration of CRISPR-Cas9 targeting <i>VEGFR2</i> reduced CNV area in both animal models	201
<i>VEGF-A</i>	non-disease mouse		SpCas9	lentivirus (single vector)	<i>in vivo</i> subretinal administration of CRISPR-Cas9 disrupted <i>VEGF-A</i> gene specifically in mouse RPE	202
<i>VEGF-A</i> and <i>HIF-1α</i>	mouse mode of laser-induced CNV		CjCas9	AAV9 (single vector)	intravitreal injection of CRISPR-Cas9 targeting either <i>VEGF-A</i> or <i>HIF-1α</i> suppressed CNV, particular in the RPE; cone dysfunction was observed in the <i>VEGF-A</i> -edited but not in the <i>HIF-1α</i> -edited group; no detectable off-target indels were noted 6 weeks after AAV9-CjCas9 injection	203
<i>HIF-1α</i>	mouse mode of laser-induced CNV		CjCas9	AAV9 (single vector)	intravitreal injection of AAV9-CjCas9 targeting <i>HIF-1α</i> induced long-term gene disruption by constitutive expression of CjCas9 nuclease without detectable off-target indels 14 months after injection; the treatment did not affect retina function or histology	204
<i>VEGF-A</i> and <i>HIF-1α</i>	mouse mode of laser-induced CNV		LbCpf1	AAV2/9 (single vector)	intravitreal injection of AAV2/9-LbCpf1 targeting either <i>VEGF-A</i> or <i>HIF-1α</i> reduced CNV area and did not affect cone function; the antiangiogenic effects of CRISPR-LbCpf1 were comparable to the aflibercept group	134
<i>VEGF-A</i>	mouse mode of laser-induced CNV	human ARPE-19 cell line	SpCas9	Cas9 ribonucleoproteins (RNPs)	Cas9 RNP reduced the VEGFA mRNA and protein levels in ARPE-19 <i>in vitro</i> ; subretinal injection of Cas9 RNPs induces indels specific in RPE cells, resulting in the reduction of VEGF-A protein and CNV; Cas9 protein was completely degraded 3 days post-injection, and no cone dysfunction was observed 7 days post-injection	205

CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats; Cas, CRISPR-associated; VEGF, vascular endothelial growth factor; rAAV, recombinant adeno-associated virus; CNV, choroidal neovascularization; NV, neovascularization; RPE, retinal pigment epithelium; HIF, hypoxia-induced factor.

Πίνακας 10: Προκλινικές μελέτες γενετικής τροποποίησης με CRISPR-Cas για τη θεραπεία της οφθαλμικής αγγειογένεσης. (Lin et al)

Προκειμένου να ξεπεραστεί η περιορισμένη χωρητικότητα των AAV, έχουν χρησιμοποιηθεί συστήματα διπλών ιικών φορέων (dual vector AAV systems), ανάλογα της Cas9 μικρότερου μεγέθους όπως η *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9 3,16 kb) και η *Campylobacter jejuni* Cas9 (CjCas9 2.95 kb) ή άλλες νουκλεάσες όπως η *Lachnospiraceae* bacterium Cpf1 (LbCpf1). Αν και η ταυτόχρονη χορήγηση διπλών ιικών φορέων AAV φάνηκε να είναι επιτυχής στην αποσιώπηση του γονιδίου στόχου, η αποτελεσματικότητά της *in vivo* είναι κατώτερη της χορήγησης ενός AAV φορέα.

Η γονιδιακή θεραπεία με βάση την CRISPR-Cas LbCpf1 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία της AMD. Η ενδοϋαλοειδική χορήγηση ενός φορέα AAV2/9 που εκφράζει μια LbCpf1 ειδική για τον VEGF-A ή τον HIF-1a (hypoxia induced factor 1a) φάνηκε να μειώνει την έκταση της χοριοειδικής νεοαγγείωσης σε πειραματόζωα. Τα αντιαγγειογενετικά αποτελέσματα του συστήματος CRISPR-Cas LbCpf1 ήταν συγκρίσιμα με την ομάδα που λάμβανε εγχύσεις aflibercept. Επιπρόσθετα, δεν παρατηρήθηκε τοξικότητα του συστήματος CRISPR-Cas LbCpf1 στους φωτοϋποδοχείς και η χρήση του φάνηκε ασφαλής. Η Cpf1 φαίνεται να έχει υψηλή εξειδίκευση στόχου στα ανθρώπινα κύτταρα με την ελάχιστη δυνατή τροποποίηση εκτός στόχου. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν τη μελλοντική χρήση της γονιδιακής τροποποίησης με LbCpf1 για τη θεραπεία της οφθαλμικής νεοαγγειογένεσης.

Η ασφάλεια του συστήματος CRISPR-Cas και ο περιορισμός των τροποποιήσεων εκτός στόχου είναι κομβικής σημασίας για τη μελλοντική χρήση του σε αγγειογενετικά οφθαλμικά νοσήματα. Για τη βελτίωση της ασφάλειας έχουν αναπτυχθεί υψηλής πιστότητας νουκλεάσες όπως οι SpCas9-HF1, HyraCas9 και eSpCas9. Επίσης ο περιορισμός δραστηριότητας της Cas9 μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη δημιουργία συστημάτων που περιέχουν anti-CRISPR πρωτεΐνες. (Lin FI et al 2020, Costa JR et al 2017)

4.8 Γονιδιακή θεραπεία - Συμπέρασμα

Οι εξελίξεις στον τομέα της γονιδιακής θεραπείας και της χρήσης τους σε οφθαλμικές παθήσεις γίνονται με ταχύτατο ρυθμό. Οι πρόσφατες κλινικές μελέτες γονιδιακής επιμήκυνσης μέσω

ικτού φορέα καταδεικνύουν ότι μπορούν να παρέχουν ένα μακροχρόνιο θεραπευτικό αποτέλεσμα σε ασθενείς με AMD μειώνοντας τη εξάρτηση από τις επαναλαμβανόμενες ενδοϋαλοειδικές ενέσεις. Αν

και η χρήση των siRNA φάνηκε να παρέχει κάποιο θεραπευτικό όφελος σε ασθενείς με AMD σε συγχορήγηση με anti-VEGF, περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες ώστε να εξακριβωθεί ο ακριβής τους ρόλος. Η γονιδιακή τροποποίηση με το σύστημα CRISPR-Cas μπορεί να είναι το μέλλον της

γονιδιακής θεραπείας. Προκειμένου να βελτιωθεί η ασφάλεια, η ειδικότητα και η αποτελεσματικότητα της γονιδιακής μεταφοράς, είναι απαραίτητη η περαιτέρω ανάπτυξη των ιικών φορέων και η βελτίωση των τεχνικών γενετικής τροποποίησης και των τεχνικών χορήγησης της γονιδιακής θεραπείας. Οι συνεχείς εξελίξεις σε κλινικό και προκλινικό στάδιο αναδεικνύουν τη γονιδιακή θεραπεία ως μια μελλοντική αποτελεσματική θεραπεία της οφθαλμικής νεοαγγείωσης.

5. Περίληψη στην Ελληνική

Παρόλες τις πρόσφατες σημαντικές εξελίξεις τόσο στη διάγνωση όσο και στη θεραπεία, η ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας του αμφιβληστροειδούς (AMD) παραμένει η κύρια αιτία τύφλωσης στον ανεπτυγμένο κόσμο. Οι anti-VEGF παράγοντες αποτελούν τη θεραπεία εκλογής της

νεοαγγειακής μορφής της νόσου αλλά δεν μπορούν να αναστρέψουν την απώλεια όρασης και ο χρόνος δράσης τους είναι βραχύς οπότε χρειάζονται επαναλαμβανόμενες εγχύσεις.

Υπάρχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για τη χρήση κυτταρικών θεραπειών στην AMD με σκοπό την αναστροφή της απώλειας όρασης. Ο έξω αμφιβληστροειδής είναι ιδανικός στην εφαρμογή κυτταρικών θεραπειών εφόσον είναι χειρουργικά προσβάσιμος, εύκολα παρατηρήσιμος στην κλινική εξέταση και με σχετικά απλή αρχιτεκτονική. Έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές κατηγορίες κυττάρων με βασικότερη τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα τα οποία διαφοροποιούμενα σε κύτταρα μελαγχρόου επιθηλίου (RPE) μπορούν να μεταμοσχευθούν σαν εναιωρήματα ή σαν 'φύλλα' κυττάρων υπό τον αμφιβληστροειδή. Οι πρώτες κλινικές μελέτες κυτταρικής αντικατάστασης με κύτταρα RPE απέδειξαν την ασφάλεια της μεθόδου και υπαινίχθηκαν και κάποια αποτελεσματικότητα. Περαιτέρω έρευνα χρειάζεται για να αντιμετωπιστούν ζητήματα όπως η ανοσολογική απόρριψη του μοσχεύματος και να εξασφαλιστεί η μακρόχρονη επιβίωση του μοσχεύματος καθώς και η μέγιστη αποτελεσματικότητά του.

Η ταχέως αναπτυσσόμενη γονιδιακή θεραπεία θα μπορούσε επίσης να παρέχει θεραπευτικές επιλογές στους ασθενείς με AMD. Η μεταφορά γονιδίων μέσω ιικών φορέων δίνει τη δυνατότητα συνεχούς παραγωγής αντιαγγειογενετικών πρωτεϊνών με σκοπό την αποφυγή των συνεχόμενων χορηγήσεων anti-VEGF παραγόντων. Η γονιδιακή αποσιώπηση μέσω παρέμβασης του RNA έχει επίσης δοκιμαστεί σε κλινικές μελέτες και θα μπορούσε να δρα συνεργιστικά με τους anti-VEGF παράγοντες. Αν και η χρήση της γονιδιακής τροποποίησης με το σύστημα CRISPR-Cas βρίσκεται σε προκλινικό στάδιο, φάνηκε να είναι αποτελεσματική για την αντιμετώπιση της νεοαγγείωσης σε ζωικά μοντέλα.

6. Summary in English

Despite recent advances in diagnosis and treatment, age-related macular degeneration (AMD) remains the commonest cause of blindness in the developed world. Anti-VEGF agents

are the mainstay of treatment of the neovascular form of the disease but they cannot reverse visual loss and they have a short time of action, so repeated injections are needed.

There has been a significant research interest in the use of cell replacement therapies in AMD in order to reverse loss of vision. The outer retina is ideal for applying cellular therapies since it is surgically accessible, easily observable and has a relatively simple architecture. A broad range of cells have been tested but predominantly pluripotent stem cells have been used. These have been differentiated into retinal pigment epithelium (RPE) cells and transplanted as cell suspensions or cell sheets under the retina. The first clinical trials of RPE cell replacement have demonstrated the safety of the method and hinted on possible efficacy. Further research is needed in order to tackle issues such as immune rejection and ensure long-term graft survival and maximal efficacy.

Gene therapy could also provide therapeutic options for patients with AMD. Gene transfer via viral vectors may enable the potential for continuous production of antiangiogenetic proteins thus avoiding the need for repeated anti-VEGF injections. Gene silencing with RNA interference has been tested in various clinical trials and could act synergistically with current anti-VEGF treatments. Even though the use of gene editing tools such as CRISPR-Cas is currently limited to preclinical studies, it has been shown to be effective in treating neovascularization in animal models.

1. Strauss O. The Retinal Pigment Epithelium. 2011 Jan 26. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* [Internet]. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995-.
2. Hoon M, Okawa H, Della Santina L, Wong RO. Functional architecture of the retina: development and disease. *Prog Retin Eye Res*. 2014 Sep;42:44-84.
3. Ludwig PE, Lopez MJ, Czyz CN. Embryology, Eye Malformations. [Updated 2020 Oct 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482496/>
4. Heavner W, Pevny L. Eye development and retinogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Dec 1;4(12):a008391.
5. Pennington KL, DeAngelis MM. Epidemiology of age-related macular degeneration (AMD): associations with cardiovascular disease phenotypes and lipid factors. *Eye Vis (Lond)*. 2016 Dec 22;3:34.
6. García-Layana A, Cabrera-López F, García-Arumí J, Arias-Barquet L, Ruiz-Moreno JM. Early and intermediate age-related macular degeneration: update and clinical review. *Clin Interv Aging*. 2017 Oct 3;12:1579-1587.
7. Shao J, Choudhary MM, Schachat AP. Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Dev Ophthalmol*. 2016;55:125-36.
8. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391):1145–1147
9. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5):861–872
10. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318(5858):1917–1920
11. Michelet, F., Balasankar, A., Teo, N. *et al*. Rapid generation of purified human RPE from pluripotent stem cells using 2D cultures and lipoprotein uptake-based sorting. *Stem Cell Res Ther* 11, 47 (2020)

12. Hsiung J, Zhu D, Rodriguez A, Hinton DR (2015) Retinal Pigment Epithelial Cell Conditioned Medium Enhances the Yield of RPE Cells Differentiated from Human Embryonic Stem Cells. *J Clin Exp Pathol* 5:216.
13. Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H. *et al.* Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 472, 51–56 (2011)
14. Bennis, A., Jacobs, J.G., Catsburg, L.A.E. *et al.* Stem Cell Derived Retinal Pigment Epithelium: The Role of Pigmentation as Maturation Marker and Gene Expression Profile Comparison with Human Endogenous Retinal Pigment Epithelium.. *Stem Cell Rev and Rep* **13**, 659–669 (2017)
15. Gong J, Fields MA, Moreira EF, Bowrey HE, Gooz M, Ablonczy Z, et al. (2015) Differentiation of Human Protein-Induced Pluripotent Stem Cells toward a Retinal Pigment Epithelial Cell Fate. *PLoS ONE* 10(11): e0143272.
16. White CE, Olabisi RM. Scaffolds for retinal pigment epithelial cell transplantation in age-related macular degeneration. *J Tissue Eng.* 2017 Jul 21;8:2041731417720841.
17. Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y et al. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med.* 2017 Mar 16;376(11):1038-1046
18. da Cruz, L., Fynes, K., Georgiadis, O. *et al.* Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration. *Nat Biotechnol* 36, 328–337 (2018).
19. Sharma R, Bose D, Maminishkis A, Bharti K. Retinal Pigment Epithelium Replacement Therapy for Age-Related Macular Degeneration: Are We There Yet? *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2020 Jan 6;60:553-572.
20. O'Neill HC, Limnios IJ, Barnett NL. Advancing a Stem Cell Therapy for Age-Related Macular Degeneration. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2020;15(2):89-97
21. Chichagova V, Hallam D, Collin J, Zerti D, Dorgau B, Felemban M, Lako M, Steel DH. Cellular regeneration strategies for macular degeneration: past, present and future. *Eye (Lond).* 2018 May;32(5):946-971
22. Maeda A, Mandai M, Takahashi M. Gene and Induced Pluripotent Stem Cell Therapy for Retinal Diseases. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2019 Aug 31;20:201-216
23. Mehat MS, Sundaram V, Ripamonti C, Robson AG, Smith AJ, Borooh S, Robinson M, Rosenthal AN, Innes W, Weleber RG, Lee RWJ, Crossland M, Rubin GS, Dhillon B, Steel DHW, Anglade E, Lanza RP, Ali RR, Michaelides M, Bainbridge JWB. Transplantation of Human Embryonic Stem

- Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells in Macular Degeneration. *Ophthalmology*. 2018 Nov;125(11):1765-1775.
24. Zarbin M, Sugino I, Townes-Anderson E. Concise Review: Update on Retinal Pigment Epithelium Transplantation for Age-Related Macular Degeneration. *Stem Cells Transl Med*. 2019 May;8(5):466-477.
 25. Costa JR, Bejcek BE, McGee JE, et al. Genome Editing Using Engineered Nucleases and Their Use in Genomic Screening. 2017 Nov 20. In: Markossian S, Sittampalam GS, Grossman A, et al., editors. *Assay Guidance Manual* [Internet].
 26. Guimaraes TAC, Georgiou M, Bainbridge JWB, Michaelides M. Gene therapy for neovascular age-related macular degeneration: rationale, clinical trials and future directions. *Br J Ophthalmol*. 2021 Feb;105(2):151-157
 27. Lin FL, Wang PY, Chuang YF, Wang JH, Wong VHY, Bui BV, Liu GS. Gene Therapy Intervention in Neovascular Eye Disease: A Recent Update. *Mol Ther*. 2020 Oct 7;28(10):2120-2138.
 28. Wooff Y, Cioanca AV, Chu-Tan JA, Aggio-Bruce R, Schumann U, Natoli R. Small-Medium Extracellular Vesicles and Their miRNA Cargo in Retinal Health and Degeneration: Mediators of Homeostasis, and Vehicles for Targeted Gene Therapy. *Front Cell Neurosci*. 2020 Jun 25;14:160.
 29. Jiang J, Zhang X, Tang Y, Li S, Chen J. Progress on ocular siRNA gene-silencing therapy and drug delivery systems. *Fundam Clin Pharmacol*. 2021 Feb;35(1):4-24.
 30. Owen CG, Jarrar Z, Wormald R, Cook DG, Fletcher AE, Rudnicka AR. The estimated prevalence and incidence of late stage age related macular degeneration in the UK. *Br J Ophthalmol*. 2012;96:752–6.
 31. Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY. Age-related macular degeneration. *Lancet*. 2012;379:1728–38.
 32. Ambati J, Atkinson JP, Gelfand BD. Immunology of age-related macular degeneration. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:438–51.
 33. Sears AE, Bernstein PS, Cideciyan AV, Hoyng C, Issa PC, Palczewski K, et al. Towards treatment of Stargardt disease: workshop organized and sponsored by the Foundation Fighting Blindness. *Transl Vis Sci Technol*. 2017;6:6.
 34. Farrar GJ, Millington-Ward S, Chadderton N, Mansergh FC, Palfi A. Gene therapies for inherited retinal disorders. *Vis Neurosci*. 2014;31:289–307.

35. Mills JO, Jalil A, Stanga PE. Electronic retinal implants and artificial vision: journey and present. *Eye*. 2017;31:1383–98.
36. Humayun MS, Weiland JD, Fujii GY, Greenberg R, Williamson R, Little J, et al. Visual perception in a blind subject with a chronic microelectronic retinal prosthesis. *Vision Res*. 2003;43:2573–81.
37. Cisko-Pakuluk A, Marycz K. A promising tool in retina regeneration: current perspectives and challenges when using mesenchymal progenitor stem cells in veterinary and human ophthalmological applications. *Stem Cell Rev*. 2017;13:598–602.
38. Aharony I, Michowiz S, Goldenberg-Cohen N. The promise of stem cell-based therapeutics in ophthalmology. *Neural Regen Res*. 2017;12:173–80.
39. Santos-Ferreira T, Llonch S, Borsch O, Postel K, Haas J, Ader M. Retinal transplantation of photoreceptors results in donor-host cytoplasmic exchange. *Nat Commun*. 2016;7:13028.
40. Singh MS, Balmer J, Barnard AR, Aslam SA, Moralli D, Green CM, et al. Transplanted photoreceptor precursors transfer proteins to host photoreceptors by a mechanism of cytoplasmic fusion. *Nat Commun*. 2016;7:13537.
41. Pearson RA, Barber AC, Rizzi M, Hippert C, Xue T, West EL, et al. Restoration of vision after transplantation of photoreceptors. *Nature*. 2012;485:99–103.
42. Zarbin M. Cell-based therapy for degenerative retinal disease. *Trends Mol Med*. 2016;22:115–34.
43. Klassen H. Stem cells in clinical trials for treatment of retinal degeneration. *Expert Opin Biol Ther*. 2016;16:7–14.
44. Mellough CB, Collin J, Sernagor E, Wride NK, Steel DH, Lako M. Lab generated retina: realizing the dream. *Vis Neurosci*. 2014;31:317–32.
45. Santos-Ferreira TF, Borsch O, Ader M. Rebuilding the missing part—a review on photoreceptor transplantation. *Front Syst Neurosci*. 2016;10:105.
46. Pearson RA, Hippert C, Graca AB, Barber AC. Photoreceptor replacement therapy: challenges presented by the diseased recipient retinal environment. *Vis Neurosci*. 2014;31:333–44.
47. MacLaren RE, Pearson RA. Stem cell therapy and the retina. *Eye*. 2007;21:1352–9.
48. Jayakody SA, Gonzalez-Cordero A, Ali RR, Pearson RA. Cellular strategies for retinal repair by photoreceptor replacement. *Prog Retin Eye Res*. 2015;46:31–66.
49. Alexander P, Thomson HA, Luff AJ, Lotery AJ. Retinal pigment epithelium transplantation: concepts, challenges, and future prospects. *Eye*. 2015;29:992–1002.

50. Kolomeyer AM, Zarbin MA. Trophic factors in the pathogenesis and therapy for retinal degenerative diseases. *Surv Ophthalmol.* 2014;59:134–65.
51. Lund RD, Adamson P, Sauve Y, Keegan DJ, Girman SV, Wang S, et al. Subretinal transplantation of genetically modified human cell lines attenuates loss of visual function in dystrophic rats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:9942–7.
52. Chirco KR, Sohn EH, Stone EM, Tucker BA, Mullins RF. Structural and molecular changes in the aging choroid: implications for age-related macular degeneration. *Eye.* 2017;31:10–25.
53. van Zeeburg EJ, Maaijwee KJ, Missotten TO, Heimann H, van Meurs JC. A free retinal pigment epithelium-choroid graft in patients with exudative age-related macular degeneration: results up to 7 years. *Am J Ophthalmol.* 2012;153:120. e122
54. MacLaren RE, Uppal GS, Balaggan KS, Tufail A, Munro PM, Milliken AB, et al. Autologous transplantation of the retinal pigment epithelium and choroid in the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2007;114:561–70.
55. Peyman GA, Blinder KJ, Paris CL, Alturki W, Nelson NC Jr., Desai U. A technique for retinal pigment epithelium transplantation for age-related macular degeneration secondary to extensive subfoveal scarring. *Ophthalmic Surg.* 1991;22: 102–8.
56. Wen R, Tao W, Li Y, Sieving PA. CNTF and retina. *Prog Retin Eye Res.* 2012;31:136–51.
57. Taylor S, Srinivasan B, Wordinger RJ, Roque RS. Glutamate stimulates neurotrophin expression in cultured Muller cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003;111:189–97.
58. Di Polo A, Cheng L, Bray GM, Aguayo AJ. Colocalization of rkb and brain-derived neurotrophic factor proteins in green-red-sensitive cone outer segments. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:4014–21.
59. Mohand-Said S, Hicks D, Dreyfus H, Sahel JA. Selective transplantation of rods delays cone loss in a retinitis pigmentosa model. *Arch Ophthalmol.* 2000;118:807–11.
60. Leveillard T, Mohand-Said S, Lorentz O, Hicks D, Fintz AC, Clerin E, et al. Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. *Nat Genet.* 2004;36:755–9.
61. McGill TJ, Cottam B, Lu B, Wang S, Girman S, Tian C, et al. Transplantation of human central nervous system stem cells—neuroprotection in retinal degeneration. *Eur J Neurosci.* 2012;35:468–77.
62. Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R, Heon E, Schwartz SB, Roman AJ, et al. Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Arch Ophthalmol.* 2012;130:9–24.

63. Ohtaki H, Ylostalo JH, Foraker JE, Robinson AP, Reger RL, Shioda S, et al. Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:14638–43.
64. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats—similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:3908–13.
65. Karl MO, Reh TA. Regenerative medicine for retinal diseases: activating endogenous repair mechanisms. *Trends Mol Med*. 2010;16:193–202.
66. Bernardos RL, Barthel LK, Meyers JR, Raymond PA. Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Muller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci*. 2007;27:7028–40.
67. Miyagishima KJ, Wan Q, Corneo B, Sharma R, Lotfi MR, Boles NC, et al. In pursuit of authenticity: induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium for clinical applications. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5:1562–74.
68. Li P, Sun X, Ma Z, Liu Y, Jin Y, Ge R, et al. Transcriptional reactivation of OTX2, RX1 and SIX3 during reprogramming contributes to the generation of RPE cells from human iPSCs. *Int J Biol Sci*. 2016;12:505–17.
69. Perales-Clemente E, Cook AN, Evans JM, Roellinger S, Secreto F, Emmanuele V, et al. Natural underlying mtDNA heteroplasmy as a potential source of intra-person hiPSC variability. *EMBO J*. 2016;35:1979–90.
70. Ortmann D, Vallier L. Variability of human pluripotent stem cell lines. *Curr Opin Genet Dev*. 2017;46:179–85.
71. Xiao J, Mai DH, Xie L. Resetting human naive pluripotency. *Genet Epigenet*. 2016;8:37–41.
72. Nakano T, Ando S, Takata N, Kawada M, Muguruma K, Sekiguchi K, et al. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell*. 2012;10:771–85.
73. Zhong X, Gutierrez C, Xue T, Hampton C, Vergara MN, Cao LH, et al. Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs. *Nat Commun*. 2014;5:4047.
74. Gonzalez-Cordero A, Kruczek K, Naeem A, Fernando M, Kloc M, Ribeiro J, et al. Recapitulation of human retinal development from human pluripotent stem cells generates transplantable populations of cone photoreceptors. *Stem Cell Rep*. 2017;9:820–37.

75. Bharti K, Miller SS, Arnheiter H. The new paradigm: retinal pigment epithelium cells generated from embryonic or induced pluripotent stem cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24:21–34.
76. Testa F, Maguire AM, Rossi S, *et al.* Three-Year follow-up after unilateral subretinal delivery of adeno-associated virus in patients with Leber congenital amaurosis type 2. *Ophthalmology* 2013;120:1283–91.
77. Weleber RG, Pennesi ME, Wilson DJ, *et al.* Results at 2 years after gene therapy for Rpe65-deficient Leber congenital amaurosis and severe Early-Childhood-Onset retinal dystrophy. *Ophthalmology* 2016;123:1606–20.
78. Rosen LS. Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control* 2002;9:36–44.
79. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. Vegf in signaling and disease: beyond discovery and development. *Cell* 2019;176:1248–64.
80. Rakic J-M, Lambert V, Devy L, *et al.* Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3186–93.
81. Ucuzian AA, Gassman AA, East AT, *et al.* Molecular mediators of angiogenesis. *J Burn Care Res* 2010;31:158–75.
82. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci* 2005;109:227–41.
83. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25:581–611.
84. Spilsbury K, Garrett KL, Shen WY, *et al.* Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization. *Am J Pathol* 2000;157:135–44.
85. Harper SJ, Bates DO. Vegf-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer* 2008;8:880–7.
86. Dehghanian F, Hojati Z, Kay M. New insights into VEGF-A alternative splicing: key regulatory switching in the pathological process. *Avicenna J Med Biotechnol* 2014;6:192–9.
87. Arcondéguy T, Lacazette E, Millevoi S, *et al.* Vegf-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level. *Nucleic Acids Res* 2013;41:7997–8010.

88. Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, *et al.* Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol* 2004;25:387–95.
89. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, *et al.* Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;187:1579–86.
90. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, *et al.* Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:9267–71.
91. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, *et al.* The FMS-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989–91.
92. Kumaran N, Michaelides M, Smith AJ, *et al.* Retinal gene therapy. *Br Med Bull* 2018;126:13–25.
93. Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, *et al.* Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol* 2002;76:791–801.
94. Day TP, Byrne LC, Schaffer DV, *et al.* Advances in AAV vector development for gene therapy in the retina. *Adv Exp Med Biol* 2014;801:687–93.
95. Grimm D, Büning H. Small but increasingly mighty: latest advances in AAV vector research, design, and evolution. *Hum Gene Ther* 2017;28:1075–86.
96. Trapani I. Adeno-Associated viral vectors as a tool for large gene delivery to the retina. *Genes* 2019;10. doi:10.3390/genes10040287. [Epub ahead of print: 09 Feb 2019].
97. Dong JY, Fan PD, Frizzell RA. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther* 1996;7:2101–12.
98. Trapani I, Colella P, Sommella A, *et al.* Effective delivery of large genes to the retina by dual AAV vectors. *EMBO Mol Med* 2014;6:194–211.
99. Arbabi A, Liu A, Ameri H. Gene therapy for inherited retinal degeneration. *J Ocul Pharmacol Ther* 2019;35:79–97.
100. Allocca M, Mussolino C, Garcia-Hoyos M, *et al.* Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. *J Virol* 2007;81:11372–80.
101. Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, *et al.* Novel properties of tyrosine-mutant AAV2 vectors in the mouse retina. *Mol Ther* 2011;19:293–301.

102. Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr Gene Ther* 2011;11:321–30.
103. Zaiss AK, Muruve DA. Immune responses to adeno-associated virus vectors. *Curr Gene Ther* 2005;5:323–31.

104. Li Q, Miller R, Han P-Y, *et al.* Intraocular route of AAV2 vector administration defines humoral immune response and therapeutic potential. *Mol Vis* 2008;14:1760–9.
105. Planul A, Dalkara D. Vectors and gene delivery to the retina. *Annu Rev Vis Sci* 2017;3:121–40.
106. MacLaren RE, Groppe M, Barnard AR, *et al.* Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *Lancet* 2014;383:1129–37.
107. Bruewer AR, Mowat FM, Bartoe JT, *et al.* Evaluation of lateral spread of transgene expression following subretinal AAV-mediated gene delivery in dogs. *PLoS One* 2013;8:e60218.
108. Stieger K, Colle M-A, Dubreil L, *et al.* Subretinal delivery of recombinant AAV serotype 8 vector in dogs results in gene transfer to neurons in the brain. *Mol Ther* 2008;16:916–23.
109. Xue K, Groppe M, Salvetti AP, *et al.* Technique of retinal gene therapy: delivery of viral vector into the subretinal space. *Eye* 2017;31:1308–16.
110. Dalkara D, Kolstad KD, Caporale N, *et al.* Inner limiting membrane barriers to AAV-mediated retinal transduction from the vitreous. *Mol Ther* 2009;17:2096–102.
111. Reid CA, Ertel KJ, Lipinski DM. Improvement of photoreceptor targeting via intravitreal delivery in mouse and human retina using combinatory rAAV2 capsid mutant vectors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58:6429–39.
112. Yin L, Greenberg K, Hunter JJ, *et al.* Intravitreal injection of AAV2 transduces macaque inner retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:2775–83.
113. Dalkara D, Byrne LC, Klimczak RR, *et al.* In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. *Sci Transl Med* 2013;5:189ra76.
114. Jüttner J, Szabo A, Gross-Scherf B, *et al.* Targeting neuronal and glial cell types with synthetic promoter AAVs in mice, non-human primates and humans. *Nat Neurosci* 2019;22:1345–56.
115. Ali RR, Reichel MB, De Alwis M, *et al.* Adeno-Associated virus gene transfer to mouse retina. *Hum Gene Ther* 1998;9:81–6.

116. Hellström M, Ruitenberg MJ, Pollett MA, *et al.* Cellular tropism and transduction properties of seven adeno-associated viral vector serotypes in adult retina after intravitreal injection. *Gene Ther* 2009;16:521–32.
117. Habet-Wilner Z, Noronha G, Wykoff CC. Suprachoroidally injected pharmacological agents for the treatment of chorio-retinal diseases: a targeted approach. *Acta Ophthalmol* 2019;97:460–72.
118. Ding K, Shen J, Hafiz Z, *et al.* AAV8-vectored suprachoroidal gene transfer produces widespread ocular transgene expression. *J Clin Invest* 2019;130:4901–11.

114

119. Peden MC, Min J, Meyers C, *et al.* Ab-Externo AAV-mediated gene delivery to the suprachoroidal space using a 250 micron flexible microcatheter. *PLoS One* 2011;6:e17140.
120. Lewis RA, von Wolff K, Tetz M, *et al.* Canaloplasty: circumferential viscodilation and tensioning of Schlemm's canal using a flexible microcatheter for the treatment of open-angle glaucoma in adults: interim clinical study analysis. *J Cataract Refract Surg* 2007;33:1217–26.
121. Jung JH, Chae JJ, Prausnitz MR. Targeting drug delivery within the suprachoroidal space. *Drug Discov Today* 2019;24:1654–9.
122. Tetz M, Rizzo S, Augustin AJ. Safety of submacular suprachoroidal drug administration via a microcatheter: retrospective analysis of European treatment results. *Ophthalmologica* 2012;227:183–9.
123. Yeh S, Kurup SK, Wang RC, *et al.* Suprachoroidal injection of triamcinolone acetonide, CLS-TA, for macular edema due to noninfectious uveitis: a randomized, phase 2 study (DOGWOOD). *Retina* 2019;39:1880–8.
124. Rasmussen H, Chu KW, Campochiaro P, *et al.* Clinical protocol. An open-label, phase I, single administration, dose-escalation study of ADGVPEDF.11D (ADPEDF) in neovascular age-related macular degeneration (AMD). *Hum Gene Ther* 2001;12:2029–32.
125. Campochiaro PA, Nguyen QD, Shah SM, *et al.* Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for neovascular age-related macular degeneration: results of a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 2006;17:167–76.
126. Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:10705–9.
127. Rakoczy EP, Lai C-M, Magno AL, *et al.* Gene therapy with recombinant adeno-associated vectors for neovascular age-related macular degeneration: 1 year follow-up of a phase 1 randomised clinical trial. *Lancet* 2015;386:2395–403.

128. Constable IJ, Pierce CM, Lai C-M, *et al.* Phase 2A randomized clinical trial: safety and post hoc analysis of subretinal rAAV.sFLT-1 for wet age-related macular degeneration. *EBioMedicine* 2016;14:168–75.
129. Heier JS, Kherani S, Desai S, *et al.* Intravitreal injection of AAV2-sFLT01 in patients with advanced neovascular age-related macular degeneration: a phase 1, open-label trial. *Lancet* 2017;390:50–61.
130. Grishanin R, Vuilleminot B, Sharma P, *et al.* Preclinical evaluation of ADVIM-022, a novel gene therapy approach to treating wet age-related macular degeneration. *Mol Ther* 2019;27:118–29.