



ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ
ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΩΝ ΓΛΑΥΚΩΜΑΤΩΝ

Εισηγητής
Π. Κουκουλομάτης

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΩΝ ΓΛΑΥΚΩΜΑΤΩΝ

Β. Παπαστεφάνου, Π. Κουκουλομάτης, Κ. Πέτρου, Ι. Δαγαλάκη

Οφθαλμολογική Κλινική, Ιπποκράτειο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γλαύκωμα είναι μία προοδευτικά εξελισσόμενη οπτική νευροπάθεια. Χαρακτηρίζεται από μία συγκεκριμένη ακολουθία βλαβών του οπτικού νεύρου και των οπτικών πεδίων με τελικό αποτέλεσμα τον θάνατο των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς.

Η παθογένεση του γλαυκώματος έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας. Η αυξημένη ενδοφθάλμια πίεση, απότοκος δυσλειτουργίας του διηθητικού ηθμού ή διαταραχής των μηχανισμών παραγωγής υδατοειδούς υγρού, αποτελεί το βασικότερο επιβαρυντικό παράγοντα. Έχουν, επίσης, ενοχοποιηθεί τόσο κληρονομικοί (γονίδια μυσσιλίνης και οπτινευρίνης) όσο και άλλοι επιβαρυντικοί παράγοντες. Αυτοί οι παράγοντες κινδύνου εκτιμάται ότι ευθύνονται για το 30% των περιπτώσεων γλαυκώματος ανοικτής γωνίας στις Η.Π.Α. και μέχρι και 70% αυτών στην Ιαπωνία. Σε αυτούς τους παράγοντες έχουν συμπεριληφθεί η συστηματική υπόταση, ορθοστατική ή νυκτερινή, η καρδιαγγειακή νόσος, ο αγγειόσπασμος (ως προς την ανάπτυξη ημικρανίας ή την ανάπτυξη νόσου Raynaud), διαταραχή των αγγειακών μηχανισμών αυτορρύθμισης, το σύνδρομο άπνοιας και άλλοι.¹

Οι Hauwirth και Beaufre² έχουν υπογραμμίσει ότι πρέπει να εκπληρώνονται τέσσερα βασικά προαπαιτούμενα κριτήρια τα οποία και πρέπει να εκπληρώνονται προκειμένου για την επιτυχή εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας.

1. Μία τεχνική αποτελεσματικής και μη τοξικής παράδοσης γονιδίων
2. Επαρκής χαρακτηρισμός του γονιδιακού υποστρώματος της νόσου ώστε να προσδιορίζεται με ακρίβεια η αντίστοιχη θεραπευτική προσέγγιση.
3. Έλεγχος της έκφρασης του θεραπευτικού γονιδίου
4. Διαθεσιμότητα ενός πειραματικού μοντέλου για τον προκλινικό έλεγχο.

Ο οφθαλμός πληρεί κάποιες από αυτές τις προϋποθέσεις. Λόγω της απουσίας λεμφικής αποχέτευσης και της ιδιαιτερότητας του ενδοφθάλμιου περιβάλλοντος δεν προκαλείται πλήρης έκφραση των ανοσολογικών μηχανισμών μετά από ένα αντιγονικό ερέθισμα (**μη τοξική παράδοση**) Το άλλο πλεονέκτημα είναι η δυνατότητα άμεσης αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας της θεραπείας με μη επεμβατικό τρόπο εκτιμώντας την λειτουργική κατάσταση του οφθαλμού. (**έλεγχος της έκφρασης**)

Ειδικά ως προς το γλαύκωμα, η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ενάντια ορισμένων στόχων-στοιχείων που

εμπλέκονται στην παθογενετική διαδικασία..

Στο **πρόσθιο ημιμόριο**, οι στόχοι αυτοί αφορούν τη δυσλειτουργία του διηθητικού ηθμού και τη διαταραχή της παραγωγής του υδατοειδούς υγρού, ενώ στο **οπίσθιο ημιμόριο** αφορούν τα γεγονότα που οδηγούν στον βλάβη και το θάνατο των γαγγλιακών κυττάρων.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ – ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΠΑΡΑΔΟΣΗΣ (DELIVERY SYSTEMS)

Φορέας (vector) είναι ο όρος που χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει ένα πλασμίδιο, δηλαδή ένα μικρό αυτόνομο αντιγραφόμενο κυτταροπλασματικό DNA που μπορεί να μεταφερθεί από οργανισμό σε οργανισμό και να ενσωματωθεί στο χρωματοσωματικό DNA του κυττάρου ξενιστή μέσα από μία διαδικασία που ονομάζεται **διαμόλυνση** (transfection). Η πλειοψηφία των φορέων είναι ιογενούς προέλευσης. Οι ιοί, από τη φύση τους, προσβάλλουν εύκολα και εξειδικευμένα τα κύτταρα που φέρουν τους αντίστοιχους ως προς αυτούς υποδοχείς. Δυστυχώς, όμως, μπορεί να προκαλέσουν έντονη ανοσολογική απόκριση. Με μεθόδους γενετικής μηχανικής, οι φορείς υπόκεινται σε τροποποίηση του γενετικού τους υλικού και των πρωτεϊνών των κυτταρικών τους περιβλημάτων ώστε να αποφεύγεται η ανοσολογική απόκριση και να εξειδικεύεται ο στόχος τους.^{1,3,4}

Έχει αναφερθεί ότι η in vivo μεταφορά εξωγενών γονιδίων εντός του οφθαλμού έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από τη χορήγηση φαρμάκων. Η εφαρμογή γονιδίων έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της χρήσης συμβατικών φαρμάκων. Καταρχήν, από τη στιγμή που εισέρχονται εντός του κυττάρου, τα γονίδια είναι σε θέση να εκφράσουν τα προϊόντα τους για πολύ περισσότερο χρόνο από τα τρέχοντα φάρμακα. Κατά δεύτερον, η τροποποίηση του γενετικού υλικού με τη χρήση συγκεκριμένων **υποκινητών** (promoters)*, οδηγεί στην έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων με απόλυτα εξειδικευμένη δράση έναντι ενός κυτταρικού τύπου. Άλλοι γεινιάζοντες ιστοί δεν επηρεάζονται με αποτέλεσμα την αποφυγή ανάπτυξης δευτερογενών αποτελεσμάτων. Τέλος, η εισαγωγή ρυθμιστικών στοιχείων στην ακολουθία τους μπορεί θεωρητικά να καθορίσει τη διάρκεια ή την ισχύ της δράσης τους.

Οι φορείς θα πρέπει να προσαρμόζονται αντίστοιχα ως προς την πάθηση στην οποία στοχεύουν. Αν και η επιτυχής στό-

* **Υποκινητής (promoter)**: περιοχή του DNA στην οποία προσδέεται η RNA πολυμεράση προτού αρχίσει τη μεταγραφή του RNA σε DNA

χευση συγκεκριμένων κυττάρων και η παράταση της γονιδιακής έκφρασης είναι οι πρωταρχικοί στόχοι για την γονιδιακή διαβίβαση υπάρχουν κάποιες καταστάσεις όπου η εκπλήρωση λιγότερων προϋποθέσεων θα ήταν όχι μόνο αποδεκτή αλλά και προτιμότερη. Υπάρχουν, επομένως, και περιπτώσεις που η παροδική έκφραση των γονιδίων προτιμάται έναντι μίας χρονικά παρατεταμένης. Το κάθε σύστημα έχει μειονεκτήματα και πλεονεκτήματα και επί της ουσίας δεν υπάρχει κανένας φορέας που να είναι ιδανικός για όλες τις στρατηγικές. Επιγραμματικά λοιπόν στις διαφορές μεταξύ των φορέων συγκαταλέγονται ο τροπισμός ως προς συγκεκριμένο ιστό, το μήκος της γονιδιακής έκφρασης, η ικανότητα μεταφοράς, η δυνατότητα ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα, η πρόκληση ανοσολογικών αντιδράσεων και η τοξικότητα.³

Τα μεταφερόμενα γενετικά στοιχεία μπορεί να είναι είτε ένα κυκλικό μόριο DNA το οποίο κωδικοποιεί μία λειτουργική πρωτεΐνη ή DNA του οποίου το μεταγραφόμενο RNA αναστέλλει την έκφραση μίας πρωτεΐνης. Επίσης, μπορεί να προκληθεί αναστολή της μετάφρασης με m-RNA αντίστροφης φοράς (antisense m-RNA), ριβοένζυμα (RNA με καταλυτική δράση) αλλά και η μεταφορά βραχέων μορίων RNA διπλής έλικας (small interference RNA – siRNA) τα οποία αποδομούν συγκεκριμένα μόρια m-RNA με ένα μηχανισμό που ονομάζεται RNA interference (RNAi)^{5,6}

ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΓΛΑΥΚΩΜΑ

ΓΕΝΙΚΑ

Στους κυτταρικούς στόχους για την εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας στο γλαύκωμα περιλαμβάνονται ο διηθητικός ηθμός, το ακτινωτό επιθήλιο, ο ακτινωτός μυς, τα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς και τα κύτταρα Muller.

ΔΙΗΘΗΤΙΚΟΣ ΗΘΜΟΣ

Ο διηθητικός ηθμός που εντοπίζεται στη γωνία κερατοειδούς και ίριδος είναι ένας σπογγώδης ιστός ο οποίος αποτελείται από ενδοθηλιακά κύτταρα και εξωκυττάριο υλικό με ιδιαίτερη αρχιτεκτονική διάταξη. Είναι ο ιστός που είναι υπεύθυνος για τη διατήρηση αντίστασης στη ροή του υδατοειδούς υγρού. Επόμενα, η τροποποίησή του έχει τη δυνατότητα να μεταβάλλει και, συνακόλουθα να επηρεάσει την ενδοφθάλμια πίεση. Δεδομένου, ότι δεν υπάρχουν φάρμακα τα οποία να έχουν εξειδικευμένη δράση στον διηθητικό ηθμό η γονιδιακή θεραπεία θα μπορούσε να καλύψει αυτό το κενό. Οι καταλληλότεροι φορείς φαίνεται να είναι οι αδενοϊοί (Ad vector) καθώς μετατρέπουν πολύ αποτελεσματικά τα κύτταρα του ηθμού ενώ έχουν αναφερθεί ικανοποιητικά αποτελέσματα και με λεντοϊούς, τον ιό του απλού έρπητα και ρετροϊούς. Η καταλληλότερη οδός χορήγησης είναι στον πρόσθιο θάλαμο. Λόγω της φυσικής ροής του υδατοειδούς υγρού, η έγχυση μεταφέρει άμεσα τους φορείς στο διηθητικό ηθμό. Η εφαρμογή της θεραπείας βρίσκεται ακόμη σε πειραματικό στάδιο με θετικά αποτελέσματα σε επίμυες, κονίκλους, μύες, κύνες και πιθήκους in vivo και σε καλλιέργειες ανθρωπείων κυττάρων διηθητικού ηθμού μεταθανάτιων δοτών in vitro. Κυρίως έχει χρησιμοποιηθεί ο υποκινητής του μεγαλοκυτταροϊού και αυτό γιατί η χρήση ευκαρυωτικών υποκινητών χαρακτηρίζεται από μία πρώιμη αναστολή της δράσης τους (early promoter shutoff), ελαττώνοντας την αποτελεσματικότητά του εγχειρήματος.^{1,3}

Η διάρκεια της έκφρασης των μεταφερόμενων γενετικών στοιχείων κυμαίνεται από 1-4 εβδομάδες με καλύτερα αποτελέσματα στα ανώτερα θηλαστικά.

Σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η μετάδοση των γονιδίων μέσω αδενοϊών με ταυτόχρονη εκπομπή πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης που επιτρέπει την μη επεμβατικού χαρακτήρα

παρακολούθηση τόσο της διαδικασίας με in vivo γωνιοσκοπία όσο και της χρονικής διάρκειας της γονιδιακής έκφρασης με τη λήψη ανέυθρων φωτογραφιών.

Ο καθορισμός του κατάλληλου δοσολογικού σχήματος που δεν προκαλεί επαγωγή της ανοσολογικής απόκρισης στην περιοχή καθιστά δυνατή την εφαρμογή πολλαπλών ενχύσεων. Ιδιαίτερα για την περίπτωση των αδενοϊών, η ανάπτυξη απόκρισης είναι δοσοεξαρτώμενη.

Γονιδιακό υλικό υπό διερεύνηση

Το γονιδιακό υλικό με θεραπευτική δράση στο διηθητικό ηθμό που βρίσκεται υπό διερεύνηση αφορά:

- τη **στρωμελυσίνη**, μία μεταλλοπρωτεΐνωση της οποίας η έκφραση συμβάλλει στην αναδόμηση του εξωκυττάρου υλικού με σκοπό την αύξηση της εκροής του υδατοειδούς.⁷
- τις **aquaporin -1 και -4**, πρωτεΐνες διαύλων ύδατος⁸
- τον αναστολέα της **Rho-4**, μίας πρωτεΐνης υπεύθυνης για την οργάνωση του κυτταρικού σκελετού
- την πρωτεΐνη **καλδεσμόνη (caldesmon)**^{9,10}, η υπερέκφραση της οποίας οδηγεί σε δραστηκή αναδιαμόρφωση του κυτταρικού σκελετού.
- Την μωσουλίνη, η αναστολή της οποίας επιδιώκεται τόσο με αδενοϊούς όσο και με siRNA¹¹

ΑΚΤΙΝΩΤΟ ΕΠΙΘΗΛΙΟ – ΑΚΤΙΝΩΤΟΣ ΜΥΣ

Το ακτινωτό επιθήλιο αποτελείται από δύο στενά συνδεδεμένες κυτταρικές στιβάδες που καλύπτουν τις ακτινωτές προεκβολές (ciliary processes). Η έξω στιβάδα που αντικρίζει τον οπίσθιο θάλαμο είναι μη χρωστικοφόρος και είναι υπεύθυνη για την έκκριση του υδατοειδούς υγρού. Από τη στιγμή της παραγωγής του, το υδατοειδές υγρό κινείται περίξ της ίριδος προς τον πρόσθιο θάλαμο και αποχετεύεται από τον οφθαλμό μέσω του διηθητικού ηθμού και του έσω τοιχώματος του καναλιού του Schlemm προς το φλεβικό σύστημα.

Ο ακτινωτός μυς εντοπίζεται πλησίον του ακτινωτού επιθηλίου και του διηθητικού ηθμού. Ο ακτινωτός μυς συσπάται στα πλαίσια του αντανάκλαστικού προσαρμογής και αλλάζει τη χωροδιάταξη του διηθητικού ηθμού, διευκολύνοντας την αποχέτευση του υδατοειδούς υγρού.

Δεδομένου ότι σημαντικός αριθμός των διαθέσιμων αντιγλαυκωματικών σκευασμάτων στοχεύει στο ακτινωτό επιθήλιο οι μελέτες γονιδιακής μεταφοράς είναι περιορισμένες. Η γονιδιακή μεταφορά με ερπητοϊούς έχει μέχρι τώρα ικανοποιητικά αποτελέσματα σε μύες και πιθήκους στο ακτινωτό επιθήλιο.

Ικανοποιητική γονιδιακή μεταφορά στον ακτινωτό μυ in vivo δεν έχει αναφερθεί μέχρι τώρα. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στο ότι δεν έχει γίνει ουσιαστική ερευνητική ενασχόληση με τον συγκεκριμένο ιστό ή λόγω του ότι ο ακτινωτός μυς είναι ανθεκτικός στην επαγωγή^{1,3}. Το τελευταίο ενδεχόμενο είναι πιθανότερο δεδομένου ότι η επαγωγή των μυϊκών κυττάρων φαίνεται να παρεμποδίζεται από το περιβάλλον των μυϊκών ινιδίων. Εν τούτοις, τα κύτταρα του ακτινωτού μύος μπορούν να επαχθούν, τουλάχιστον με τους ερπητοϊούς in vitro. Επίσης, αναφέρθηκε πολύ πρόσφατα η ικανοποιητική μεταφορά γενετικού υλικού στον ακτινωτό μυ μέσω παλμικής ηλεκτρομεταφοράς πλασμιδίων. (plasmid pulse electrotransfer) σε επίμυες με σκοπό την τροποποίηση της γενετικής πληροφορίας ως προς την έκφραση του TNF.¹²

Γονιδιακό υλικό υπό διερεύνηση

Τα γονίδια στα οποία θα μπορούσαν δυνητικά να αναπτυχθούν θεραπευτικές εφαρμογές στο ακτινωτό επιθήλιο είναι τα γονίδια που ελέγχουν τον κρκαδιανό ρυθμό παραγωγής του υδα-

τοιειδούς με σκοπό την ελάττωση της αυξημένης παραγωγής κατά τη διάρκεια των νυκτερινών ωρών¹³ ή τα γονίδια που ελέγχουν την έκφραση των β-αδρενεργικών υποδοχέων με σκοπό την αύξηση της αποκρισμότητας των κυττάρων του ακτινωτού επιθηλίου στα αντιγλαυκωματικά σκευάσματα. Ως προς τον ακτινωτό μυ, οι μελλοντικές κατευθύνσεις αφορούν την αύξηση της εντοπισμένης σύνθεσης προσταγλανδινών και μεταλλοπρωτεϊνών.

ΓΑΓΓΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΥΣ

Τα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς, τα κύτταρα της εσώτερης στιβάδας του αμφιβληστροειδούς, είναι υπεύθυνα για τη μεταγωγή του φωτεινού ερεθίσματος προς τον εγκέφαλο μέσω των νευραξόνων τους, οι οποίοι σχηματίζουν το οπτικό νεύρο. Βλάβη και απώλεια των γαγγλιακών κυττάρων και συνακόλουθα των νευραξόνων τους προκαλείται από διάφορα ερεθίσματα με πρωταρχικό την αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης.

Ο θάνατος των γαγγλιακών κυττάρων επέρχεται με αποπτωτικούς μηχανισμούς – αυτό δε είναι το τελικό στάδιο όχι μόνο στην περίπτωση του γλαυκώματος, αλλά και στις οπτικές νευροπάθειες. Ακόμη και εάν δεν είναι γνωστό ποιος είναι ο ειδικός μηχανισμός που επάγει την αποπτωτική διαδικασία, η χρήση αντιαποπτωτικών παραγόντων ή νευροτροφικών παραγόντων, με σκοπό την αύξηση της βιωσιμότητας των γαγγλιακών κυττάρων, θα μπορούσε να είναι θεραπευτικά χρήσιμη.⁶

Είναι τώρα πλέον αποδεδειγμένο ότι η ενδοϋαλοειδική έγχυση είναι η προτιμώμενη οδός για την παροχή γονιδίων στα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς δεδομένου ότι η μεμονωμένη έγχυση των αντιαποπτωτικών ή των νευροτροφικών παραγόντων έχει βραχύ χρόνο ημιζωής και γίνεται καθ' επανάληψιν με όλους τους κινδύνους που συνεπάγεται αυτό.⁴

Η αποτελεσματικότητα των παραγόντων έχει μελετηθεί με συστήματα αδενοϊών, ή συγγενών ως προς αυτούς συστημάτων (adeno-associated viruses – AAV), με ιούς του απλού έρπητα και με λεντοϊούς.^{3,6}

Η ενδοϋαλοειδική χορήγηση των Ad φορέων έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα στα κύτταρα Muller, αλλά όχι στα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς. Τα κύτταρα Muller φαίνεται να αποτελούν σημαντικές πηγές νευροτροφικών παραγόντων οπότε, συμπερασματικά, η θεραπευτική δράση είναι έμμεση ως προς τα γαγγλιακά κύτταρα.¹⁴

Οι AAV φαίνεται να έχουν οροειδικό τροπισμό (selective stereotypic tropism) για τα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς. Οι ενδοϋαλοειδικές εγχύσεις σε επίμους έχουν αποτελεσματικότητα μέχρι και 72% με τη μέγιστη έκφραση να επιτυγχάνεται δύο και τέσσερις εβδομάδες μετά την έγχυση. Αυτή η υψηλή αποτελεσματικότητα μπορεί να αποδοθεί στην έκφραση πρωτεογλυκανών θειικής ηπαράνης στη μεμβράνη των γαγγλιακών κυττάρων οι οποίες και διαμεσολαβούν για την πρόσδεση των AAV στα κύτταρα. Οι πρωτεογλυκάνες αυτές είναι επίσης υποδοχείς και του HSV

Η παράδοση μέσω HSV φαίνεται να είναι αποτελεσματική στα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς. Μία εφ'άπαξ ενδοϋαλοειδική έγχυση φαίνεται να προκαλεί αποτελεσματικότητα μέχρι και 50% στους επίμους ενώ με επαναλαμβανόμενες εγχύσεις, τα ποσοστά αποτελεσματικότητας που αναφέρονται είναι ακόμη υψηλότερα. Στα ανώτερα θηλαστικά η αποτελεσματικότητα εντοπίζεται πλησιέστερα ως προς το σημείο της έγχυσης. Έχει επίσης, προκληθεί και επαγωγή των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς μετά από έγχυση στο άνω διδύμιο (στερεοτακτικά).

Στις ανωτέρω μεθοδολογίες η διάρκεια δράσης της έκφρασης κυμαίνεται από 3-4 εβδομάδες μέχρι και 7 μήνες για κάποια πειραματικά μοντέλα.

Γονιδιακό υλικό υπό διερεύνηση

Στους νευροτροφικούς παράγοντες περιλαμβάνονται:

- Ο BDNF (νευροτροφικός παράγοντας του εγκέφαλου - brain derived neurotrophic factor) που χορηγείται ενδοϋαλοειδικά με τη διαμεσολάβηση αδενοϊών και φαίνεται ότι προστατεύει τα γαγγλιακά κύτταρα σε ένα μοντέλο διατομής οπτικού νεύρου. Τα κύτταρα Muller επάγονται από τους Ad και η αύξηση της επιβίωσης των γαγγλιακών κυττάρων οφείλεται στην έκκριση του BDNF από αυτά τα κύτταρα. Η τελική προστατευτική δράση ήταν χρονικά περιορισμένη.¹⁵
 - ο Εναλλακτικά, η μεταφορά του γονιδίου του TrkB – υποδοχέα του BDNF – με AAV φορέα σε συνδυασμό με την εξωγενή χορήγηση BDNF αυξάνει σημαντικά την επιβίωση των νευρώνων. Το 76% των κυττάρων παρέμειναν ζωντανά δύο εβδομάδες μετά από τη διατομή, μία χρονική περίοδος κατά την οποία το 90% των κυττάρων χάνονται εάν δεν εφαρμοστεί θεραπεία.¹⁶
 - ο Η προστατευτική δράση του BDNF μεταφερόμενου με φορέα AAV αυξήθηκε μετά από τη συνδυασμένη χορήγηση του αντιοξειδωτικού S-PBN.¹⁵
- Ο CNTF (νευροτροφικός παράγοντας του ακτινωτού γαγγλίου – ciliary neurotrophic factor) έχει προκαλέσει ανάλογα αποτελέσματα.¹⁷
- Επίσης έχει μελετηθεί και ο GDNF (νευροτροφικός παράγοντας των νευρογλοιακών κυττάρων – glial cell derived neurotrophic factor) με δοσοεξαρτώμενη αποτελεσματικότητα και παράταση της ζωής των γαγγλιακών κυττάρων κατά 14 ημέρες σε επίμους.¹⁸

Ως προς τους αντιαποπτωτικούς παράγοντες έχουν μελετηθεί:

- Η ανασταλτική πρωτεΐνη της απόπτωσης XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis) μέσω αδενοϊών η οποία αναστέλλει την κασπάση-3 και άλλες πρωτεΐνες της αποπτωτικής διαδικασίας.¹⁹
- Αναστολέας της Bax – πρωτεΐνης με σημαντικό ρόλο στην αποπτωτική διαδικασία. Η αναστολή της Bax σε συνδυασμό με αναστολή του c-Jun και του Araf-1 (apoptosis protease-activating factor 1) έχει επίσης επιτευχθεί και με την έγχυση αντίστοιχων siRNA στην εγγύς μοίρα του οπτικού νεύρου με αποτέλεσμα την παράταση της βιωσιμότητας των γαγγλιακών κυττάρων.^{4,20}

ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΓΛΑΥΚΩΜΑΤΟΣ

Η γονιδιακή θεραπεία επίσης εφαρμόζεται με σκοπό την παρεμπόδιση της αναπλαστικής (proliferative) εποπλωτικής απόκρισης που μπορεί να αναπτύχθει μετά από συριγγοποιητική επέμβαση. Χρησιμοποιήθηκε ένας Ad φορέας που κωδικοποιεί τον αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p21.²¹ Οι Perkins και άλλοι²² ανέστειλλαν την ανάπτυξη ινοβλαστών της Τενονίου κάψας σε κόνι κλους μετά από την εφ'άπαξ χορήγηση rAd-p21 τοποθετώντας έναν εμβαπτισμένο σπόγγο για 5 λεπτά. Αυτή η δράση είχε ως αποτέλεσμα την διατήρηση λειτουργικών φυσαλίδων ακόμη και 30 ημέρες μετά την επέμβαση χωρίς τη σημαντική επίπτωση στους ιστούς που παρατηρείται με τη χορήγηση μιτομυκίνης.

Ανάλογα αποτελέσματα μετά από διαμόλυση (transfection) του επιπεφυκότα σε κόνι κλους με MMP-3 (matrix metalloproteinase 3) είχαν και οι Mamiya και συνεργάτες²³. Διαπιστώθηκε παράταση της βιωσιμότητας της λειτουργικής φυσαλίδας.

Τέλος, ένας πιθανός στόχος είναι η αναστολή της υπέρμετρης δράσης της MMP-9 (matrix metalloproteinase 9) σε περιπτώ-

ση υπερβολικής διαρροής της λειτουργικής φυσαλίδας.

ΜΕΜΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ

Συνοπτικά, είναι σαφές ότι σταδιακά αναπτύσσονται τα μέσα για την ανάπτυξη γονιδιακής θεραπείας με σκοπό την αντιμετώπιση του γλαυκώματος. Είναι επίσης σαφές ότι πολλαπλές θεραπευτικές στρατηγικές είναι διαθέσιμες για την επίδραση του ρυθμού παραγωγής και αποχέτευσης του υδατοειδούς υγρού με σκοπό τη ρύθμιση της ενδοφθάλμιας πίεσης και την παρεμπόδιση της απόπτωσης των γαγγλιακών κυττάρων. Έτσι το πεδίο της γονιδιακής θεραπείας του γλαυκώματος θα έχει σημαντικό ρόλο στον περιορισμό της τύφλωσης που επιφέρει η νόσος. Εν τούτοις, η μελέτη πολλών παραμέτρων δεν έχει ακόμη ολοκληρωθεί. Πρέπει να γίνει καλύτερα κατανοητός ο ρόλος του εξωκυττάρου υλικού, της αναδόμησης του κυτταροσκελετού και τα γεγονότα παραγωγής και μετάδοσης διαφόρων ερεθισμάτων στο διηθητικό ηθμό. Πρέπει να υπάρξει καλύτερη αντίληψη των μηχανισμών κυτταρικού θανάτου που ενεργοποιούνται στα γαγγλιακά κύτταρα μετά από διάφορα νοσογόνα ερεθίσματα και υπό συνθήκες αυξημένης ή μη ενδοφθάλμιας πίεσης. Είναι απαραίτητο να αναπτυχθούν τα κατάλληλα πειραματικά μοντέλα που μπορούν να μιμηθούν τις αλλοιώσεις του ακτινωτού επιθηλίου και του διηθητικού ηθμού που επιφέρουν την αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης. Πρέπει επιπρόσθετα να γίνουν καλύτερα αντιληπτές οι αποκρίσεις της χυμικής και της κυτταρικής ανοσίας στα διάφορα συστήματα φορέων. Οι προσπάθειες αναγνώρισης και άλλων γονιδίων που σχετίζονται με την παθογένεση του γλαυκώματος θα δώσουν ακόμη περισσότερα στοιχεία για την ανάπτυξη νέων στρατηγικών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Borras T., Brandt CR, Nickels R, Ritch R. Gene therapy for glaucoma: Treating a multifaceted, chronic disease. *Inv Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43(8): 2513-2517
- Hauswirth WW, Beaufre L. Ocular gene therapy: quo vadis *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 Sep;41(10):2821-6.
- Borras T. Recent developments in ocular gene therapy. *Exp Eye Res* 2003; 76: 643-652
- Thanos C, Emerich D. Delivery of neurotrophic factors and therapeutic proteins for retinal diseases. *Expert Opin Biol Ther*. 2005 Nov;5(11):1443-52
- Campochiaro PA. Potential applications for RNAi to probe pathogenesis and develop new treatments for ocular disorders. *Gene Therapy* 2006; 13: 559-562
- Harvey ARM Hu Y, Leaver SG, Mellough CB, Park K, Verhaagen J, Plant GW, Cui Q. Gene therapy and transplantation in CNS repair: The visual system. *Prog Ret Eye Res* 2006; 25: 449-489
- Kee C, Sohn S, Hwang JM. Stromelysin gene transfer into cultured human trabecular cells and rat trabecular meshwork in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Nov;42(12):2856-60
- Wang F, Feng XC, Li YM, Yang H, Ma TH. Aquaporins as potential drug targets. *Acta Pharmacol Sin*. 2006 Apr;27(4):395-401
- Gabelt BT, Hu Y, Vittitow JL, Rasmussen CR, Grosheva I, Bershadsky AD, Geiger B, Borras T, Kaufman PL. Caldesmon transgene expression disrupts focal adhesions in HTM cells and increases outflow facility in organ-cultured human and monkey anterior segments. *Exp Eye Res*. 2006 Jun;82(6):935-44
- Grosheva I, Vittitow JL, Goichberg P, Gabelt BT, Kaufman PL, Borras T, Geiger B, Bershadsky AD. Caldesmon effects on the actin cytoskeleton and cell adhesion in cultured HTM cells. *Exp Eye Res*. 2006 Jun;82(6):945-58
- Kanagavalli J, Pandaranayaka E, Krishnadas SR, Krishnaswamy S, Sundaresan P. A review of genetic and structural understanding of the role of myocilin in primary open angle glaucoma. *Indian J Ophthalmol*. 2004 Dec;52(4):271-80
- Bloquel C, Bejjani R, Bigey P, Bedioui F, Doat M, BenEzra D, Scherman D, Behar-Cohen F. Plasmid electrotransfer of eye ciliary muscle: principles and therapeutic efficacy using hTNF-alpha soluble receptor in uveitis. *FASEB J*. 2006 Feb;20(2):389-91
- Li Y, Lu D, Ge J, Li Y, Zhuo Y, Sears ML. Identified circadian rhythm genes of ciliary epithelium with differential display Yan Ke Xue Bao. 2001 Sep;17(3):133-7.
- Rudzinski M, Wong TP, Saragovi HU. Changes in retinal expression of neurotrophins and neurotrophin receptors induced by ocular hypertension. *J Neurobiol*. 2004 Feb 15;58(3):341-54.
- Ko ML, Hu DN, Ritch R, Sharma SC. The combined effect of brain-derived neurotrophic factor and a free radical scavenger in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 Sep;41(10):2967-71.
- Zhou Y, Pernet V, Hauswirth WW, Di Polo A. Activation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway by AAV gene transfer protects retinal ganglion cells in glaucoma. *Mol Ther*. 2005 Sep;12(3):402-12.
- Ji JZ, Elyaman W, Yip HK, Lee VW, Yick LW, Hugon J, So KF. CNTF promotes survival of retinal ganglion cells after induction of ocular hypertension in rats: the possible involvement of STAT3 pathway. *Eur J Neurosci*. 2004 Jan;19(2):265-72
- Wu WC, Lai CC, Chen SL, Sun MH, Xiao X, Chen TL, Tsai RJ, Kuo SW, Tsao YP. GDNF gene therapy attenuates retinal ischemic injuries in rats. *Mol Vis*. 2004 Feb 10;10:93-102
- Renwick J, Narang MA, Coupland SG, Xuan JY, Baker AN, Brousseau J, Petrin D, Munger R, Leonard BC, Hauswirth WW, Korneluk RG, Tsiflidis C. XIAP-mediated neuroprotection in retinal ischemia *Gene Ther*. 2006 Feb;13(4):339-47
- Lingor P, Koeberle P, Kugler S, Bahr M. Down-regulation of apoptosis mediators by RNAi inhibits axotomy-induced retinal ganglion cell death in vivo *Brain*. 2005 Mar;128(Pt 3):550-8
- Atencio IA, Chen Z, Nguyen QH, Faha B, Maneval DC. p21WAF-1/Cip-1 gene therapy as an adjunct to glaucoma filtration surgery. *Curr Opin Mol Ther*. 2004 Dec;6(6):624-8
- Perkins TW, Faha B, Ni M, Kiland JA, Poulsen GL, Antelman D, Atencio I, Shinoda J, Sinha D, Brumback L, Maneval D, Kaufman PL, Nickells RW. Adenovirus-mediated gene therapy using human p21WAF-1/Cip-1 to prevent wound healing in a rabbit model of glaucoma filtration surgery *Arch Ophthalmol*. 2002 Jul;120(7):941-9
- Mamiya K, Ohguro H, Ohguro I, Metoki T, Ishikawa F, Yamazaki H, Takano Y, Ito T, Nakazawa M. Effects of matrix metalloproteinase-3 gene transfer by electroporation in glaucoma filter surgery. *Exp Eye Res*. 2004 Sep;79(3):405-10