

2000'li Yıllara Girerken Retina Hastalıklarının Gen Tedavisi*

Güngör SOBACI¹

ÖZET

2000'Lİ YILLARA GİRERKEN RETİNA HASTALIKLARININ GEN TEDAVİSİ

Vücutta gözdekinden daha fazla oranda kalıtsal hastalık içeren bir organ yoktur¹. Gözde yaşam boyu süren ve yaşamsal önemi bulunan kalıtsal ve edinsel hastalıkların pek çoğunun yer aldığı retina, gen tedavisi için yakın bir gelecekte hedef doku olarak görülmektedir. Bu makalede, retina hastalıklarının gen tedavisindeki klinik öncesi gelişmeler ve sorunlar gözden geçirilerek bu tedavinin klinikte uygulanabilirliği konusu irdelenmektedir.

ANAHTAR KELİMELEER : Gen tedavisi, retina.

SUMMARY

GENE THERAPY FOR RETINAL DISORDERS TOWARD YEAR 2000

No other organ in the body except the eye has a higher percentage of disorders arising primarily from genetic causes¹. The retina which has the most of vital and lifelong important disorders of hereditary or acquired origin in the eye seems to be the target tissue in the near future. In this article, reviewing preclinical studies, applicability of this mode of therapy in the clinic was discussed. **Ret-vit 2000; 8: 187-196.**

KEY WORDS : Gene therapy, retina.

DNA molekülünün çift sarmal yapısının Watson ve Crick tarafından 1953 yılında tanımlanması ile birlikte 1968 yılında ilk gen klonlaması ve 1971 yılında ilk DNA sekansı başarıldı. İnsan genomunun 3,3 milyar baz çiftinden oluştuğu, insan bünyesinde 100.000 civarında eksprese gen bulunduğu bildirilmektedir². Bunlardan 4000'den fazlasında tek gen bağımlı hastalık belirlenmişti³. Bu miktarın yeni moleküler genetik yöntemlerin uygulanması ile günümüzde daha da artması ola-

sıdır. Vücutta gözdekinden daha fazla oranda genetik kökenli hastalık içeren bir organ yoktur¹. Yüzbin genden 2000'inin gözde; bunlardan 1500'ünün ise retinada bulunduğu bildirilmektedir⁴. Oftalmoloji ve özellikle retina hastalıkları genetik bilimin gelişmesinde öncü olmuştur^{1,3,5,6}.

Gen Tedavisi

Doğumsal ve edinsel hastalıkların, hücresel düzeyde genetik modifikasyonla tedavisidir. Bu tedavide hastalıkların oluşum mekanizmalarına yönelik, moleküler düzeyde yani köktenci bir yaklaşım söz konusudur. Bu-

* TOD Ankara Şubesi 1999 Şubat Ayı Bilimsel Toplantısı'nda kısmen sunulmuştur.

1 Doç.Dr., GATA Göz AD., Öğretim Üyesi.

rada üzerinde işlem yapılan nesne, özgün hücre işlevlerini ya da yapısal protein oluşumunu sağlayan temel kalıtım birimi olan genlerdir³. Gen tedavisi etik nedenlerle insan germinal hücrelerine uygulanmaz. Gen tedavisi, hedef hücreye yabancı olan DNA sekansının bu hücrede kalıcı bir şekilde bağlanarak bu hücreden yeterli miktarda sunulmasını (ekspresyonunu) gerektirir. Bu maksatla, işlevsel gen: (1) insan bedeninde (in vivo) hedeflenip etkinleştirilmekte, (2) dış ortamda (eks vivo) yönlendirilip bedende etkinlik göstermektedir⁷.

Gen tedavisinde genetik özelliklerin hedef hücreye taşınabilmesi için aracı moleküllere (vektörler) gereksinim vardır. Bunlar: (1) viral veya (2) viral olmayan taşıyıcılardır^{7,8}.

Viral taşıyıcı olarak pek çok RNA ve DNA virüsleri kullanılmışsa da günümüzde en sık kullanılanları: Retroviruslar (RV), Adenovirus (AV) ve Adeno-bağımlı virus (ABV)'tür. Bunlar, rekombinan teknoloji ürünü, enfeksiyon oluşturabilme özellikleri kaybettirilmiş olan virüslerdir^{8,9}.

Viral olmayan taşıyıcılar arasında en sık kullanılanlar lipozom aracılı uygulamalar ve mikroenjeksiyon uygulamalarıdır^{8,9}. Günümüzde viral taşıyıcılar yeğlenmektedir³. Bununla birlikte, gerek viral gerekse nonviral taşıyıcıların birbirine kıyaslanabilir özellikleri ve buna bağlı olarak da gen tedavisi uygulamalarında öncelikleri vardır^{3,7,10,11,12,13}.

Gen tedavisi uygulamalarında temel yaklaşımlar:

A. Dominan yaklaşım: Zararlı gen ekspresyonunun önlenmesidir, örneğin proliferatif vitreoretinopati (PVR) ve proliferatif diyabetik retinopati'de olduğu gibi.. Bunun için: (1) geni yo-

ketmek, (2) gen ürünlerini yoketmek, (3) hücreyi yoketmeye yönelik girişimlerden birinin başarılması gerekir.

B. Resesif yaklaşım: İşlevsel gen aktarımı ile hastalık tedavi edilir, örneğin retinitis pigmentosa'da Fosfodiesteraz-Beta (PDE-β) ve retinoblastoma'da Rb gen transferi gibi...

İnsanda gen tedavisi uygulamaları :

İlk gen tedavisi 14 Eylül 1990 tarihinde Adenozin Deaminaz (ADA) enzim eksikliğine bağlı "Ciddi İmmün Yetmezlik" hastalığı olan 4 yaşındaki bir kız çocuğunda uygulandı¹⁴. Hem hücresel hem de hümmoral immünitenin yetmezliğine bağlı olarak oldukça hızlı ve ölümcül seyirli bu hastalık tedavisindeki başarılı sonuçlar, gen tedavisinin klinik uygulamadaki yerini sağlamlaştırmıştır. 1992 yılında 12 olan FDA (Federal Drug Administration) ve RAC (Recombinant Advisory Committee) onaylı protokol sayısı, 1996'da 120 protokol ve 1000'den fazla hastayı kapsamış iken, 1997'de 2000'den fazla protokol ve 2000'den fazla hastaya ulaşmıştır³. Günümüzde en sık uygulanan gen tedavisi uygulamalarının başında kanser, AIDS ve kistik fibrozis gelmektedir³. Göz hastalıkları halen gen tedavisi protokolleri arasında yer almamaktadır. Nedeni, ağırlıklı olarak, ilk yıllarda bu tedavinin emniyeti konusundaki çekincelerin, bu tedaviyi, ölüm riskinin yüksek olduğu olgularla sınırlamasıdır⁸.

Retina hastalıklarında gen tedavisi:

Retinanın kalıtsal vasıflı hastalıklarının insidensleri (örneğin ritinitis pigmentosa 1/4000 olgu) oldukça yüksek olup edinsel olanları da dahil pek çoğunda körlük kaçınılmazdır ve sosyoekonomik yanları ile toplumsal bir sorundur. Bu hastalıkların pek çoğunun patofizyolojisi tanımlanmış olup, iç ve dış ortam-

daki taşıyıcı sistemlerinin etkinliği ve emniyetinin araştırılabileceği uygun hayvan modelleri vardır.

Bu özellikleri ile beraber, göz gen tedavisi için ilgi çekici bir organdır. Göz küresinin anatomik ve işlevsel bütünlüğünün oluşturduğu kapalı ortam yanısıra, subretinal alanın immün özgünlüğü gen tedavisinin lokalize, emniyetli ve etkin olarak uygulanmasına olanak sağlayabilir. Deneysel uygulamalarda sistemik yerine, topikal, subtenon, intrakameral, intravitreal ve subretinal enjeksiyonlar ile gözde gen tedavisinin emniyetli ve kolay bir şekilde hedef hücreye yönelimi sağlanabilmektedir. Bu nedenlerle retina hastalıkları 2000'li yıllarda gen tedavisine aday hastalıkların başında gelmektedir.

Oftalmolojideki ilk gen tedavisi Doheny Göz Enstitüsü'nde Stephen J.Ryan ve ark. tarafından PVR geliştirilen tavşan gözlerinde gerçekleştirilmiştir¹⁵. Bu çalışmada dominant yaklaşım yani ölümcül gen tedavisi uygulanmıştır. Bu tedavi, normalde retina ve vitreusta Herpes Simpleks Virus Timidin Kinaz (HSV-TK) geni bulunmadığı; bu genin varlığında HSV'ye özgün nükleosid analogu olan Gansiklovir'in sistemik ya da lokal uygulamasının hücre içinde sitotoksik trifosfatlara dönüşerek, DNA Polimeraz enzimi inhibe etmesi ile HSV-TK içeren, yani transdüksiyona uğrayan hücreleri öldürdüğü gerçeğine dayanmaktadır. Bu çalışmada PVR'nin önlenmesinde transfekte hücrelere komşu hücrelerde de tedavi edici etkinlik yani "bystander etki"nin önemli bir katkısı bulunduğu anlaşılmıştır. Retina dekolmanı tedavisindeki önemli başarısızlık nedeni olarak güncelliğini koruyan PVR için gen tedavisi protokolü Ryan

ve arkadaşları tarafından hazırlanmış ve FDA'dan onay beklemektedir⁴.

Retinitis Pigmentoza (RP)'da gen tedavisi:

RP'da 22 allelik heterojenite ve 70 dominant gen mutasyonu saptanmıştır⁶. Yani genetik heterojenite gösterir. Bunun mevcut mutasyonların üçte biri kadarı olduğu belirtilmektedir¹⁶. RP için iyi tanımlanmış hayvan modelleri vardır. En önemlisi farelerdir. Bunların genomları oldukça iyi tanımlanmıştır ve genomların değiştirilmesi kolaydır, transjenik uygulama ile otozomal dominant ve hedeflenmiş gen tahribi yoluyla da resesif RP modelleri oluşturulabilmektedir^{17,18}.

Siklik guanozin mono fosfat (c-GMP) beta alt ünitesi (PDE-β)'ndeki mutasyonlar fare, köpek, insanlarda ve diğer bazı canlılarda otozomal resesif geçişli retina dejenerasyonu ile sonuçlanırlar. Doğal olarak bu mutasyonun izlenebildiği en tipik örnek retina dejenerasyonlu (rd) fareleridir. Bunlar rod özgün PDE-β genindeki mutasyonlar doğum sonrası hızlı ilerleyen ve öncelikli olarak rodların ölümü ile sonuçlanan retinit pigmenter tablosu gösterirler. RP'da Rodopsin yanısıra PDE-β, Periferin/Rds, ROM-1, CGMP ve Miyosin VII-A genlerinde mutasyon saptanmıştır^{5,6}. Tüm retina distrofilerinde olduğu gibi RP'da da fotoreseptörlerin ölümüne yol açan temel patolojik mekanizma apoptozistir (programlı hücre ölümü) ve bu hastalardaki gen mutasyonları ile tetiklenmektedir^{6,19,20}. RP'da gen tedavisi yapılabilmesi için mutasyonların olduğu fotoreseptörler tabakasına ulaşılmalıdır. Bununla birlikte normalde nöronal yapıda ve bölünme göstermeyen bu hücrelerin iç ortamda yeterli transdüksiyonu oldukça güç bir işlemdir. Bu maksatla, civarda bu bakımdan daha elverişli

bir yapı gösteren retina pigment epiteli (RPE) nin transdüksiyonu sağlanıp, komşuluğundaki fotoreseptörlere yapısal olmayan fonksiyonel gen, sekresyon ya da diffüzyon yolu ile ulaştırılabilir. Fotoreseptörlere gen transferi için subretinal enjeksiyon, intravitreal enjeksiyona göre daha etkili gözükmetedir. Oysa, intravitreal uygulamanın ganglion hücrelerine geni daha kolay ulaştırdığı anlaşılmıştır. Subretinal uygulamada gen transferinin yalnızca bu alanla sınırlı kalması önemli bir sorun olarak görülmektedir. Bu sorun, bu tedavinin daha geniş bir alanda uygulanması veya aynı taşıyıcının RPE'de oluşturacağı transdüksiyon yoluyla yakınındaki fotoreseptörlere gen transferini artırması ile aşılabilir. Fotoreseptörlerdeki kalıtsal defekti düzeltmeye yönelik ilk çalışma Bennett ve arkadaşları tarafından 1996'da rapor edilmiştir. Bu çalışmada normal PDE-β için kemirici cDNA'sı taşıyan CMV (Sitomegalovirüs) ile yönlendirilen AV (Ad. CMVβPDE), rd farelerde subretinal alana enjekte edilmiş ve bu alanda kontrollere kıyasla 6 hafta süren işlevsel gen ekspresyonu ile fotoreseptör kaybının ve retina dejenerasyonunun hızında yavaşlama sağlanmıştır²¹. Bu çalışmadaki diğer çok önemli bir bulgu, bu hayvan uygulamasında optik sinir ve beyin başta olmak üzere diğer organlarda gen transferinin oluşmadığını immün histokimyasal boyama ve PCR (Polimerase Chain Reaction) ile ortaya konmasıdır. Saperstein ve ark ABV ile muayimnelerde fotoreseptöre özgün gen aktarımını başardıklarını bildirmekte-dirler²². Reichel ve ark., rds farelerde subretinal enjeksiyon ile işlevsel Periferin geninin aktarımını başarmışlardır²³.

Ribozom aracılı gen transferi ile otozomal dominan RP'lı sıçanlardaki fotoreseptör de-

jenerasyonu 3 ay süreyle yavaşlatılabilmektedir²³. Ribozomların ABV'e klonlanması ile alınan olumlu sonuçlar diğer bir çalışmada da doğrulanmıştır²⁴.

RP'da gen tedavisinin apoptoza yol açan genler üzerinden de yapılabilmesi mümkündür. Bu maksatla RP'da kurtarıcı genlerin kullanımı ön plandadır. Örneğin, proapoptotik özellikteki P53 ve c-fos genlerinin tahrip edildiği mutant farelerde hücre ölüm süresi geciktirebilmiştir²⁰. Ayrıca apoptoz düzenleyicisi olan Bax grubu ve bunlardan en tanınanı Bcl-2'nin aşırı eksprese edilmesi halinde fotoreseptör ölümünün önlediği bir grup tarafından ileri sürülmüşse de diğerlerince bu desteklenmemiştir^{10,25,26,27}. Ayrıca, antisens yaklaşımlarla bu genlerin bloke edilmesi ya da artırılmasının mümkün olduğu bilinmektedir.

Bazı büyüme faktörlerinin retina dejenerasyonu üzerindeki olumlu etkilerinin açıklık kazanması ile bu yolun gen tedavisinde kullanılmasına yönelik girişimlerde artma gözlenmektedir. Bu faktörlerin göz içi enjeksiyonlarında transjenik hayvanlarda ve iyatrojenik hasarlı modellerde kıyaslanabilir sinir hücresi koruyucu etkinlik saptanmıştır^{28,30}. BFGF-2 salgılayan fibroblastlar bu maksatla kullanıldıklarında RCS ratlarındaki fotoreseptör dejenerasyonunu azaltabilmişlerdir³¹. AV vektör aracılı CNTF (Siliyer Nörotrofik Faktör) gen transferinin aynı vektörle yapılan PDE-β transferinden 10 kat daha etkili olabildiği bildirilmiştir²¹. BDNF (Beyin Büyüme Faktörü)'nin retina ganglion hücrelerini, CNTF ve BFGF (Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü)'nün ise fotoreseptörleri daha iyi koruduğu bildirilmektedir²⁰. Viral taşıyıcı ile rekombinan büyüme faktör salınımında özgün olarak hedef hücreye yönelim zorunlu değildir; bu nedenle

insanlarda uygulanabilmesi kolay gözükmemektedir.

Retina distrofisi gibi yaşam boyu ve yaşamsal olma niteliğindeki bir hastalık için işlevsel gen sunumunun süreklilik göstermesi gereklidir. Bennett ve arkadaşları rd farelerde 100 gün süreyle gen ekspresyonu gözlemişlerdir²⁶. Ancak, zaman içinde transdüksiyon gösteren hücre sayısı azalmıştır. Bunun olası iki nedeni vardır. Birincisi, hücrelerden gen sunumu yapılmaktadır ancak bunlar düzenleyici elamanlarının işlevlerini kaybetmesi ile tesirsiz hale gelmişlerdir. RP için düşünüldüğünde, örneğin fotoreseptöre özgün promotörlerin kullanılması bu sorunu çözmekle kalmaz hedefe özgün yönelimi de gerçekleştirebilir. İkincisi, virüsün veya taşıdığı genin toksik etki ile ilgili gen ya da hücrelerinin kaybına yolaçmasıdır. AV'ler 3 hafta civarında immün sistem tarafından tanımlanarak transjen sunum süreci kısılabilmektedir. HIV (İnsan İmmün Yetmezlik Virusü) kullanıldığında uzun süreli gen sunumu ile rd farelerde yeterli tedavi edici etkinlik sağlanabildiği bildirilmiştir³². Bu alandaki en önemli gelişmelerden biri antijenik elamanlardan ayıklanmış enkapside AV mini kromozomu (EAM) dur. Bu taşıyıcı aynı zamanda daha fazla taşıma kapasitesine sahiptir. Rd farelerde 18 haftaya dek EAM aracılı PDE-β transjen sunumu sağlanabilmiştir³³. Akimoto ve ark. Herpes simpleks Tip-1 virion proteinin hedef yanı sıra civarındaki diğer hücrelere de geçişi ile retina dejenerasyonlarının tedavisinde hücrelerarası gen aktarımı için yeni bir seçenek olduğunu bildirmektedirler³⁴. Subretinal alanının immün yapısının özgünlüğü ve enflamatuvar yanıtı kısmi duyarsızlığı bilinmekle birlikte, gen tedavisi uygulamalarında bu durumun değişmeyeceği garanti edil-

memekte; gen tedavisinin sonuçlarından söz edebilmek için daha uzun süreli gözlemlere gereksinim duyulmaktadır.

Diyabetik Retinopati'de gen tedavisi :

Paryani ve ark. iyi hazırlanmış fibronektin-antisens oligonükleotidlerin dış ortamda perisitlerde, iç ortamda da retina vasküler hücrelerinde yeterli transdüksiyon sağladıklarını bildirmektedirler³⁵. Murata ve ark. fotokoagülasyon uyguladıkları tavşan ve maymun gözlerinde RV kullanarak oldukça uzun süreli ve yüksek transdüksiyon etkinliğinde gen sunumunu sağlayabilmişlerdir. Yazarlar antianjiyojenik gen transferi ile fotokoagülasyon etkinliğini artırılabilirliğini bildirmektedirler³⁶.

Yaşa Bağlı Maküla Dejenerasyonu (YBMD)'nda gen tedavisi :

Murata ve ark, Lazer fotokoagülasyon ile Koroid neovaskülarizasyonu (KNV) oluşturdıkları sıçan gözlerinde RV vektörün subretinal enjeksiyonu ile, 4 ay süreli yeterli düzeyde, tanıtıcı (repoter) gen sunumunu sağlamışlardır³⁷. Bu çalışmada belirgin "bystander" etkinlik saptanmıştır. Aynı çalışma grubu aynı yöntem ile maymun gözlerinde de benzer sonuçlar gözlemişlerdir³⁶. Flöresein anjiyografik ve histopatolojik çalışmalarında foveanın korunduğu saptanmıştır. Ryan grubu submaküler membran eksizyonu sonrası yeni KNV'larının önlenmesinde, cerrahi sırasında bu alana TK geni transferi ile suisid gen tedavisi yapılabileceğini; ya da antianjiyojenik özellikteki genlerin aktarılabilirliğini bildirmektedirler³⁷. Takahashi ve ark. RPE hücre kültüründe oligonükleotid ve TIMP-3 gen aktarımı ile sıçan gözlerinde KNV'ları inhibe etmişlerdir³⁸. Akimoto ve ark. hücre gelişiminin düzenleyen E2F Cis elemanının klonlanmış oligonükleotidlerinin fibroblast kültüründeki çoğalmayı

önlediğini bildirmektedirler³⁹. Sakamoto ve ark. AV ile çözünür VEGF/Fit-1 reseptör gen transferi sağladıkları sıçanlarda KNV gelişiminin önlediğini bildirmektedirler⁴⁰. Ayrıca, lazer fotokogulasyonu ile KNV oluşturulan sıçan gözlerinde Nükleer Faktör-Kappa B (NFκB)'yi bloke eden sentetik Oligodeoksinükleotid (ODN) intravitreal verildiğinde KNV hücrelerinde transdüksiyon sağlanabilmiştir⁴¹. Murata ve ark.'nın lazer fotokogulasyonlu gözlerindeki etkin gen transferi deneyimi YBMD'da da uygulanabilir özellikler taşımaktadır. Bununla birlikte subretinal cerrahi ile genetik modüle RPE'nin transplantasyonu bu konudaki ümit verici gelişmelerdir^{8,36,42,43}. Gen tedavisindeki bu deneysel başarılar, yakın gelecekte YBMD'nin fizyopatogeneze yönelik olarak, anormal gen, örneğini VEGF ekspresyonlarının önlenmesi ya da yetersiz gen, örneğin katalaz enzimi, ekspresyonlarının tamamlanması olasılığını artırmaktadır. Ancak, burada YBMD'nun tek bir gen denetiminde olmadığı, oldukça kompleks bir geçiş şekli olduğu göz önüne alınmalıdır.

Mukopolisakkaridoz'da gen tedavisi :

Stramm ve ark. β Glukuronidaz enzim eksikliği olan mutant köpek (MPS-VII) hücrelerinin kültür ortamında RV ile transdüksiyonunda yeterli enzim aktivitesi sağlamışlardır⁴⁴. Verdugo ve ark. dış ortamda gen aktarımı sağladıkları MPS-VII köpek hücrelerini, lizozomal enzim eksikliğine bağlı hastalığı olan aynı hayvanlara verdiklerinde başarılı olduklarını bildirmektedirler⁴⁶. Dally TM ve ark. MPS-VII'li yenidoğan farede AV aracılı Beta Glukuronidaz geninin IV (intravenöz) enjekte ettiklerinde beyinde mikroglia hücreleri ve meneksler başta olmak üzere dalak karaciğer, böbrek ve retinadan bu

lizozomal depolama hastalığının 1. haftadan başlamak üzere 16. haftaya kadar ayıklandığını göstermişlerdir⁴⁶. Yenidoğanda hızlı organ gelişim sürecinde dahi IV yolla uygulandığında terapötik etkinliğin temini önemli bir bulgudur.

Retinoblastoma'da gen tedavisi :

Habis tümörlerin normal tümör süpressör gen (Retinoblastoma: Rb gen-) replasmanı ile önlenmediği gözlenmiştir⁴⁷. Hayashi ve arkadaşları retinoblastoma hücre kültüründe ve bu hücrelerin yerleştirildiği farelerde öldürücü gen tedavisi uygulamışlar ve transfekte olmayan hücrelerde "bystander etki" gözlemişlerdir⁴⁸. Hurwitz ve arkadaşları retinoblastomada gen replasmanı (Rb) ve öldürücü gen tedavisini kıyaslamışlar ve öldürücü gen bystander etkiden kaynaklanan daha fazla antitümör etkinlik gösterdiğini saptamışlardır⁴⁹.

Proliferatif Vitreoretinopati (PVR)'de gen tedavisi :

Ryan ve ark. çalışması ile birlikte antiapoptotik ajanlar ve büyüme faktörlerinin gen tedavisi ile aktarımının retina dekolmanlı gözde anatomik ve görsel başarıyı artırabileceği gösterilmiştir^{15,20,50,51}. Okazaki ve ark. PVR gelişiminde rolü olduğu düşünülen sitokinlerin oluşumunda düzenleyici rolü olan NFIB'nin kültür ortamında RPE proliferasyonunun önlediğini göstermişlerdir⁵². Akimoto ve ark. hücre çoğalmasını kontrol eden E2F transkripsiyon faktörü inhibe eden oligonükleotidlerin insan tenon fibroblast kültüründe etkili olduğunu belirlemişlerdir³⁹.

Güncel gen tedavisinde sorunlar :

Özetle bunlar : (1) henüz, gen tedavisinde kullanılan vektörlerin transdüksiyon etkinliği düşüktür, (2) mevcut vektörlerle hedefe tam

yönelim ve ulaşımı zor olmaktadır, (3) hedefte kalıcı gen ekspresyonu tam olarak başarılmamaktadır, (4) gen tedavisinin akıbetini tayin etmek zor olmaktadır, (5) taşıyıcılara karşı bağışıklık gelişebilmektedir, (6) deneysel koşullardaki sonuçların değerlendirimi ve kliniğe geçirilmesi konusunda yetersizlikler ve çekinceler vardır.

Retinanın belirli alanlarında ortaya çıkan hastalıklar ile bu alandaki gen ekspresyonları (Rod Opsin PDE, RDS-Periferin, ROM (Rod Outer Membrane Protein), OAT (Ornithine Amion Transpherases), CHM (Choroideremia), TIMP (Tissue inhibitor of Metalloproteinases)-3 ve kırmızı/yeşil pigment) insan ve maymun gözlerinde oldukça uygun bir yerleşim göstermektedir (özellikle CHM ve OAT). İlgili genin bu hastalıkların ortaya çıkmasında kaydedeğer bir rolü bulunduğu anlaşılmakla birlikte, bölgesel gen ekspresyonunda tek bir fotoreseptör alt tipinin belirleyici olmadığı, bunda çevresel (beslenme, hücre içi ve hücreler arası etkileşim gibi.) faktörlerin de rolü olduğu ileri sürülmüştür⁵³.

Gen tedavilerinde işlevin tam ve sürekli olarak düzeltilip düzeltilemeyeceği bilinmemektedir. Ayrıca, bu tedavi sonucunda sağlanan büyüme faktör artışının hastalıklı bünyedeki büyüme faktörleri arasındaki dengeyi nasıl etkileyeceği de merak edilmektedir. Gupta ve arkadaşları AV ile BFGF'ü subretinal olarak verdiklerinde retinal hücrelerle sınırlı olan gen aktarımının, intravitreal verildiğinde kornea endoteli, trabeküler hücreler ve iristeki hücrelerde de gözlendiğini; gerek sağlam, gerekse rds'li gözlerde ciddi neovasküler yapılar geliştirdiğini bildirmişlerdir⁵⁴. Transjenik hayvanlarda işlevsel de olsa hastalıklarının yerine konacak genin aşırısı

bizzat retina dejenerasyonunu artırmaktadır⁵⁵. Günümüzde kanser tedavisinde öldürücü gen tedavisi uygulanan olgulardaki ilk sonuçlar (çoğunluğu 1. fazdadır) deneysel çalışmalardaki başarıya ulaşmamıştır⁵⁶. Bunda deneysel ve doğal koşullar arasındaki farklılıklar gözönünde tutulmalıdır. Retina hastalıklarının çoğu genetik heterojenitesi, fenotipik değişkenlik göstermesi, dijenik, polijenik ve mültifaktöryel etyolojileri ile gen tedavisi çalışmalarını yavaşlatmaktadır. Gen tedavisinden önce gen taramalarına yönelik tam duyarlı tarama testlerinin geliştirilmiş ve mutasyon analizinin eksiksiz yapılabildiği olması gerekmektedir. Halen ticari maksatlı tarama testleri yetersiz görülmektedir^{57,58}. Tüm bunlara ilaveten, insan çalışmalarına geçebilmek için bu genlerin, gen tedavisi ile oluşan yeni ortamdaki dengeleri nasıl etkileyecekleri de tam olarak ortaya konmalıdır.

Gen tedavisindeki yenilikler :

Gen tedavisi araştırmalarında dominan geçişi temsilde transjenik hayvanların avantajları çok iyi bilinmektedir. Bununla birlikte resesif modeller için "knock out" yöntemi ile dominan allel dışlanarak yokluğunda oluşacak fenotip belirlenebilmektedir. Geliştirilen gen hedefleme (gene targeting) yönteminde ise tek bir baz değişikliğine bağlı kontrollü mutasyonların izlenebildiği mutant fareler üretilmektedir. Embriyonik doğurgan hücrelerin kültür ortamında işlenmesine olanak sağlayan bu yöntem sayesinde retinadaki genlerin işlevlerini belirlemek mümkün olabilmektedir. Harrington ve ark'nın işlevsel insan kromozomlarını (yapay kromozom) icadı ile başlayan gelişmeler insan vücuduna sağlıklı genlerin aktarımında mevcut araçların yetersizliğinden kaynaklanan sorunları çözebilecektir^{59,60}. Rolling ve ark. çalışmaları

Yeşil Flöresan Protein (GFP) taşıyan ABV ile enfekte sıçan retina hücrelerinin fotoğraflanabildiğini, yani canlı ortamda gen tedavisinin izlenebildiğini bildirmektedirler⁶¹.

1990 yılında başlatılan ve 15 yıllık bir sürecin öngörüldüğü İnsan Genom Projesi (Human Genom Project) ile tam bir genetik ve tamskript haritası ile tam sekansın başarılması hedeflenmektedir. A.B.D.'de "Moleküler Tıp 2020 Projesi" ile de yaşam tarzının düzenlenmesi, koruyucu tedavi, genetik tedavi ve doğum öncesi danışmanlıkta devrim yapılması hedeflenmektedir. Bu proje kapsamında, katarakt ve glokom yanısıra yaşa bağlı makula dejenerasyonu ve diyabetik retinopati ile melanoma gibi önemli oftalmik sorunlara moleküler düzeyde çözüm getirilmesi, örneğin sürekli mutasyon analizi uygulaması planlanmıştır. Tüm bu gelişmeler ışığında yakın bir gelecekte retina hastalıkları için gen tedavisinin güncelleştiği "moleküler cerrahi" yöntemlerden söz edilebilecektir.

Sonuç olarak, günümüzde genetik ve moleküler biyoloji bilimlerindeki hızlı gelişmeler ve doku mühendisliğinin giderek güncelleşmesi, yaşamsal önemi bulunan herediter ve edinsel retina hastalıkları için gen tedavisini yakın bir gelecekte klinikte uygulanabilir bir tedavi olma potansiyelinde tutmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Bateman JB : Genetics and ophthalmology. 100 years of evolution. *Ophthalmology* 1996;103 (8):S66-S73.
2. Damji KF, Allingham RR: Molecular genetics is revolutionizing our understanding of ophthalmic disease. *Am. J. Ophthalmol* 1997;124:530-543.
3. Russell SJ: Science, medicine, and the future. *Gene therapy*. *BMJ* 1997;315:1289-1292.
4. Prof. Dr. Stephen J. Ryan ile görüşme, AAO 1998, New Orleans, A.B.D.
5. Della NG: The revolution in molecular genetics and its impact on ophthalmology. *Aust NZJ Ophthal* 1996; 24(2): 85-95.
6. Inglehearn CF: Molecular genetics of human retinal dystrophies. *Eye* 1998; 12: 571-579.
7. Murata T, Kimura H, Sakamoto T, et al: Ocular gene therapy: Experimental studies and clinical possibilities. *Ophthalmic Res* 1997;29:242-251
8. Pasternale JJ: Human somatic cell gene therapy. In Glick BR and Pasternale JJ: *Molecular biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA*, ASM Press, Washington DC 1994, Chapter 17, P:403-420.
9. Glick BR: Transferring genes into mammalian cells. In *Molecular biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA*, ASM Press, Washington DC 1994, Chapter 12, P: 213-234.
10. Reichel MB, Ali RR, Hunt DM, et al: Gene therapy for retinal degeneration. *Ophthalmic Res* 1997; 29: 261-268.
11. Wilson JM: Vectors-shuttle vehicles for gene therapy. *Clin Exp Immunol* 1997; 107(Suppl 1): 31-32.
12. Ali RR, Hunt DM, Bhattacharya SS: Gene therapy for inherited retinal degeneration. *Br J Ophthalmol* 1997;81:795-801.
13. Stout T; Gene therapy in ocular diseases. *Ophthalmology* 1995; 104 (10): 1415-1416.
14. Sakamoto T, Kimura H, Scuric Z, et al: Inhibition of experimental proliferative vitreoretinopathy by retroviral vector mediated transfer of suicide gene. *Ophthalmology* 1995; 102 (10): 1417-1424.
15. Anderson WF: Human gene therapy. *Science* 1992; 256: 808-813.
16. Fulton AB, Breton ME; Clinical Physiology of heritable photoreceptor disease. *Arch Ophthalmol* 1993; 111: 1479-1481.
17. Zack DJ: Of mice and men : What mice can teach us about human ophthalmic disease. *Arch Ophthalmol* 1993; 111: 911-913.
18. Peterson-Jones SM: Animal models of human retinal dystrophies. *Eye* 1998; 12: 566-570.
19. Chang GC, Hao Y, Wong F: Apoptosis: A common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice *Neuron* 1993;11: 595-605.
20. Luthert PJ, Chong V: Photoreceptor rescue. *Eye* 1998; 12: 591-596.

21. Bennett J, Tanabe T, Sun D, et al: Photoreceptor rescue in retinal degeneration (rd) mice by in vivo gene therapy. *Nat Med* 1996; 2(6): 649-654.
22. Saperstein JG, Flannery WW, Noyd E, et al: Photoreceptor-specific gene transfer in the primate retina using the Adeno-Associated Virus (AAV) vector. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(4):S760.
23. Lewin AS, Drenser KA, Hauswirth WW, et al: Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Med* 1998; 4(8): 967-971.
24. Whalen PO, Nash MI, Hauswirth WW: The use of ribozymes as a therapy for autosomal dominant retinitis pigmentosa. *ARVO* 1999; 40 (4):S760.
25. Rosenbaum DM, Singh M, Rosenbaum PS, et al: Adenovirus-mediated gene transfer of Bci-2 to the retina. *ARVO* 1999; 40 (4):S937.
26. Bennett J, Zeng Y, Bajwa R, et al: Adenovirus-mediated delivery of rhodopsin promoted bci-2 results in a delay in photoreceptor cell death in the rd/rd mouse. *Gene Ther* 1998; 5(9): 1156-1164.
27. Tsang SH, Chen J, Kjeldbye H, et al: Retarding photoreceptor degeneration in Pdeg/Pdeg mice by an apoptosis suppressor gene. *IOVS* 1997; 38(5): 943-950.
28. McGee LH, Lau D, Zhou S, et al: Rescue of photoreceptor degeneration in S334TER(4) Mutant rhodopsin transgenic rats by Adeno-Associated Virus (AAV)-mediated delivery of Basic fibroblastic growth factor (FGF-2), *ARVO* 1999; 40(4):S936.
29. Akimoto M, Miyatake SI, Kogishi J-I, et al: Adenovirally expressed Basic Fibroblastic growth factor rescues photoreceptor cells in RCS rats. *IOVS* 1999; 40(2): 273-279.
30. Perkins BD, Wilson JH, Wensel TG: Triplex-directed site specific DNA photo-crosslinking by oligonucleotides targeted to multiple sites in the human rhodopsin gene. *ARVO* 1999; 40(4):S760.
31. Uteza Y, Rouillot JS, Kobetz A, et al: Intravitreal transplantation of encapsulated fibroblasts secreting the human fibroblast growth factor 2 delays photoreceptor cell degeneration in RCS rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(6): 3126-3131.
32. Takabashi M, Miyoshi H, Verma LM, et al: Rescue of photoreceptor degeneration in the rd mouse by HIV vectormediated gene transfer. *ARVO* 1998; 40(4): 5151.
33. Kumar-Singh R, Farber DB: Encapsidated adenovirus mini-chromosome-mediated delivery of genes to the retina: application to the rescue of photoreceptor degeneration. *Human Mol Genet* 1998; 7 (12): 1893-1900.
34. Akimoto M, Ichikawa M, Kikuchi T, et al: Intercellular delivery of gene products into retina. *ARVO* 1999; 40(4):S935.
35. Paryani GB, Kao R, Thompson T, et al: Delivery of fibronectin-antisense oligonucleotides into retinal pericytes in vitro and retinal vascular cells in vivo. *ARVO* 1999; 40(4):S937.
36. Murata T, Hoffmann S, Ishibashi T, et al: Retrovirus-Mediated gene transfer targeted to retinal photocoagulation sites. *Diabetologia* 1998; 41: 500-506.
37. Murata T, Hangai M, Ishibashi T, et al: Retrovirus-Mediated gene transfer targeted to photocoagulation-induced choroidal neovascular membranes. *IOVS* 1998; 39(12): 2474-2478.
38. Takabashi T, Nakamura T, Hayashi A, et al: Gene therapy by tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) prevents choroidal neovascularization (CNV). *ARVO* 1999; 40(4):S938.
39. Akimoto M, Hangai M, Okazaki K, et al: Inhibition of human tenon's fibroblastic cell proliferation in vitro using synthetic oligonucleotides containing E2F Cis element. *ARVO* 1997;38(4):S1133.
40. Sakamoto T, Honda M, Ishibashi H, et al: Experimental subretinal neovascularization (SRN) is inhibited by soluble VEGF/Fit receptor gene transfection by an Adenoviral vector. *ARVO* 1998; 39 (4): 3021.
41. Otsuji T, Ogata N, Uyama M, et al: In vivo transfection of Cis element "Decoy" against NFkB binding site into choroidal neovascularization. *ARVO* 1999;40 (4):S937.
42. Schubert CA, Kimura H, Spee C, et al: Retrovirus-mediated transfer of the suicide gene into retinal pigment epithelial cells in vitro. *Curr Eye Res* 1997;656-662.
43. Wright AF: Gene therapy for the eye. *Br J Ophthalmol* 1997; 81: 621-623.
44. Stramm LE, Wolfe JE, Schucman EH, et al: β -Glucuronidase mediated pathway essential for retinal pigment epithelium degradation of Glycosaminoglycans. Disease expression and in vitro disease correction using retroviral mediated cDNA transfer. *Exp Eye Res* 1990;50:521-531.

45. Verdugo M, Salvetti A, Moullicr P, et al: Adeno- and Adeno Associated Virus-mediated β -Glucuronidase cDNA transfer to treat storage in Mucopolysaccharidosis VII affected eyes. ARVO 1999; 40(4):S936.
46. Daly TM, Vogler C, Levy B et al: Neonatal gene transfer leads to widespread correction of pathology in a murine model of lysosomal storage disease. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96(5):2296-2300.
47. Huang HJS, Yee JK, Shew JY, et al: Suppression of the phenotype by replacement of the Rb gene in human cancer cells. Science 1988; 242: 1563-1566.
48. Hayashi N, Ido E, Obtsuki Y, et al: An experimental application of gene therapy for human retinoblastoma. IOVS 1999; 40(2): 265-272.
49. Hurwitz RL, Rivera AL, Holcombe VN, et al: Gene Therapy for retinoblastoma: A comparison of gene replacement with the retinoblastoma gene to suicide gene therapy with Herpes Simplex Thymidine Kinase and Ganciclovir. ARVO 1999;40(4):S761.
50. Adler R: Mechanisms of photoreceptor death in retinal degenerations. Arch Ophthalmol 1996;114: 79-83.
51. Fisher SK, Guerin CJ, Linberg GA, et al: BDNF promotes outer segment regeneration in experimentally detached retina IOVS (Suppl) 1995;36:963.
52. Okazaki K, Hangai M, Akimoto M, et al: A novel method for inhibiting proliferation of human RPE cells by suppressing NF κ B, a transcription factor for cytokines. ARVO 1997; 38(4):S1133.
53. Bernstein SL, Wong P: Regional expression of disease-related genes in human and monkey retina. Mol Vis 1998;4:24.
54. Gupta A, Zeng Y, Dudus L, et al: Ocular neovascularization after Adenovirus-mediated delivery of Basic Fibroblastic Growth Factor. ARVO 1998; 39 (4):5148.
55. Olsson JE, Gordon JW, Pawlyk BS, et al: Transgenic mice with a rhodopsin mutation (Pro23His): A mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. Neuron 1992; 9: 815-830.
56. Martin LA, Vile R, Lemoine NR, et al: Genetic prodrug activation therapy. The Lancet 1997;350: 1793-1794.
57. Editorial: The Lancet 1997; 350:969.
58. Harbour JW: Overview of RB gene mutations in patients with retinoblastoma. Implications for clinical genetic screening. Ophthalmology 1998; 105(8): 1442-1447.
59. Harrington JJ, Van Bokkelen GV, Mays RW, et al: Formation of de novo centromeres and construction of first generation human artificial minichromosomes. Nat Genet 1997;15: 345-355.
360. Swift M, Shapiro LR: Common diseases and human artificial chromosomes. The Lancet 1997; 350 (Suppl III): 8.
61. Rolling F, Shen WY, Tabarias H, et al: Evaluation of AAV mediated gene transfer into the rat retina by clinical fluorescent photography. ARVO 1999; 40(4): S.936.