

# Hereditier Retina Hastalıklarında Gen ve Kök Hücre Tedavisi

## *Gene and Stem Cells Therapy in Hereditary Retinal Dystrophies*

Ayşe ÖNER<sup>1</sup>

1- Prof. Dr., Erciyes Üniversitesi  
Tıp fakültesi, Göz Hastalıkları  
Anabilim Dalı

Geliş Tarihi - Received: 03.01.2017

Kabul Tarihi - Accepted : 12.01.2017

Ret-Vit Özel Sayı 2017;25: 44-52

Yazışma Adresi / Correspondence Address:

E-mail: aoner@erciyes.edu.tr, ayseozoner@gmail.com

Phone: +90 352 437 7163

## ÖZ

Hereditier retina distrofileri (HRD) klinik ve genetik açıdan çeşitlilik gösteren retinanın dejeneratif hastalıklar grubudur. Bu hastalıklar gece görme bozukluğu, renk görme bozukluğu, görme alanı kaybı ve total körlükle sonuçlanabilir. Bu hastalık grubunda gelişimsel ve fonksiyonel aşamada rol alan 120 den fazla gen mutasyonunun sorumlu olabileceği saptanmıştır. Son yıllarda meydana gelen gelişmeler genetik patogenezin daha iyi anlaşılmasına ve gen replasman tedavilerinin uygulanabilmesine yol açmıştır.

Anatomik ve immunolojik özelliklerinden dolayı göz gen tedavilerinin uygulanabilmesi için uygun bir organdır. Son gelişmeler ışığında vektör aracılı gen replasman tedavileri oldukça yol katetmiştir. İlk klinik çalışmalardan alınan sonuçlar oldukça ilgi uyandırmış ve insanlarda intraokuler viral vektörlerin güvenli ve etkili olduğunu göstermiştir.

Kök hücreler farklılaşmamış, kendi kendini yenileyebilme ve vücuttaki diğer matür hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Bu hücrelerin yüksek proliferasyon yeteneği vardır ve bir kök hücre kaynağından sayısız matür hücre gelişebilir. Bu nedenle son yıllarda değişik patolojiler için hücre replasman tedavisi çalışılmaktadır. Bu tedavi ile hastalıklı retinadaki hasarlı retina hücrelerinin kök hücre kaynağından farklılaşan yeni retina hücreleri ile yer değiştirmesi amaçlanmaktadır. Kök hücreler ayrıca immunoregülasyon, nöronlarda anti-apoptozis, nörotrofin sekresyonu gibi pek çok farklı fonksiyon da gösterir. Son yıllarda deneysel uygulamalarda meydana gelen gelişmeler ışığında HRD'de kök hücre kullanımı ile ilgili faz I/II klinik çalışmalar yapılmış ve cesaret verici sonuçlar alınmıştır. Bu derlemede HRD'lerinde gen tedavisi ve kök hücre konusundaki son gelişmeler ve klinik çalışmaların sonuçları özetlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Hereditier retina hastalıkları, stem cell, gen tedavisi

## ABSTRACT

Hereditary retinal dystrophies (HRDs) are degenerative diseases of the retina which have marked clinical and genetic heterogeneity. Common presentations among these disorders include night or colour blindness, tunnel vision and subsequent progression to

complete blindness. The known causative disease genes have a variety of developmental and functional roles with mutations in more than 120 genes.

Significant advancements have been made in understanding the genetic pathogenesis of ocular diseases, and gene replacement has been implicated as a potentially efficacious therapy. Because of its favorable anatomical and immunological characteristics, the eye has been at the forefront of translational gene therapy. Recent improvements have been made in the safety and specificity of vector-based ocular gene transfer methods. The results from the first clinical trials have generated great interest and have demonstrated the safety and efficacy of intraocular administrations of viral vectors in humans.

Stem cells are undifferentiated cells which have the ability to self-renew and differentiate into mature cells. They are highly proliferative, implying that an unlimited number of mature cells can be generated from a given stem cell source. On this basis, cell replacement therapy has been evaluated in recent years as an alternative for various pathologies. Cell replacement therapy hypothesizes that new retinal cells could be generated from stem cells so as to replace the damaged cells in the diseased retina. In addition, stem cells are able to perform multiple functions, such as immunoregulation, anti-apoptosis of neurons and neurotrophin secreting. With recent progress in experimental stem cell applications, several phase I/II clinical trials were approved and we have the promising and encouraging results from these stem cell clinical trials. This review summarizes the clinical developments of stem cells and retinal gene therapy in HRD.

**Key words:** Hereditary retinal dystrophies therapy

## HEREDİTER RETİNA HASTALIKLARINDA GEN TEDAVİSİ

Gen tedavisi ile ilgili düşünceler DNA'nın keşfinden hemen sonra başlar. İnsanda gen tedavisi çalışmalarının geçmişi 1960-1970 yıllarına dayanır. Ancak gen ekspresyonunun çok iyi anlaşılammış olması ve gen uygulaması için uygun yöntemin bulunammış olması nedeniyle ilk uygulamalar başarısız olmuştur. Son 20 yılda değişik hastalık gruplarında 1500'den fazla gen tedavisi ile ilgili klinik çalışma başlatılmıştır.<sup>1-5</sup>

Göz; anatomik olarak küçük ve kapalı bir organ olması, immün yapısının özellikli olması ve kolay ulaşılabilir olması nedeniyle her zaman gen tedavisinin odak noktası olmuştur. Ayrıca günümüzde mevcut olan in vivo noninvasiv görüntüleme teknikleri nedeniyle tedavinin seyrini takip etmek ve sonuçları kontrol olarak kullanılan diğer gözle karşılaştırmak gen tedavisi için ayrı bir avantaj sağlamaktadır.<sup>6, 7</sup>

Gen tedavisinin en çok çalışıldığı hastalık grubu, henüz etkin bir tedavisi olmayan herediter retina distrofileridir (HRD). Nadir görülen bu hastalık grubunun insidansı 1/3000'dür. HRD içinde en sık görüleni retinitis pigmentosadır (RP). Bunun yanında Leber'in konjenital körlüğü (LKK), Stargardt makula distrofisi (SMD), Best'in makula distrofisi (BMD) ve çok daha nadir görülen diğer retina distrofileri de bu grubun içinde bulunurlar. Tüm HRD düşünüldüğünde 200'ün üzerinde etkilenmiş genden bahsedilebilir. Aynı gen içinde farklı mutasyonlar olabilir ve bu mutasyonlar farklı fenotiplere yol açabilir. Bu durum hastalıklarla ilgili genetik çeşitliliği daha da karmaşık hale getirmektedir. Son yıllarda meydana gelen gelişmeler genetik patogenezin daha iyi anlaşılmasına ve gen tedavilerinin uygulanabilmesine yol açmıştır.<sup>8-10</sup>

Gen tedavileri günümüzde vektörler (taşıyıcı) aracılığıyla yapılmaktadır.

## GEN TEDAVİSİNDE KULLANILAN VEKTÖRLER

Vektör tiplerine bakıldığında gen tedavisinde kullanılan iki tip vektör mevcuttur. Bunlar viral vektörler ve nonviral vektörler olarak tanımlanır.

### VİRAL VEKTÖRLER

#### Retroviral vektörler:

Retroviral vektörler olarak gammaretrovirüs ve lentivirüsler kullanılmıştır. Oftalmolojide kullanımları yoktur.<sup>11</sup>

#### Adenovirüsler:

Adenovirüsler lineer çift sarmallı DNA'ya sahip bir ailedir. Bu virüsler ev sahibi hücrelerin hücre siklusüne girmezler dolayısıyla hücre ölümüne yol açmazlar. Ayrıca viral DNA ev sa-

hibi hücrelerin genomuna integre olmadığı için bu hücrelerde mutageneze yol açmazlar. Adenovirüs geni uyum sağladığı hücre içinde stabildir. Ayrıca kapasitesi de oldukça yüksektir. Bu nedenlerle gen tedavisinde daha çok dikkat çekmektedir. Viral DNA'nın replikasyonda görev yapan bölümü çıkarılarak virüs vektör haline getirilir. Çıkarılan bölümün büyüklüğüne göre taşıma kapasitesi arttırılır.<sup>12</sup>

### Adeno-associated virüsler (AAV):

AAV adenovirüs destekli bir parvovirüstür. Rekombinant adeno-associated virüs (rAAV) günümüz gen tedavisinde en çok kullanılan virüstür. Patojenitesi yoktur, inflamatuvar cevap oluşturmaz, bu nedenle gen tedavisinde büyük avantaja sahiptir AAV küçük bir DNA'ya sahiptir ve kapasitesi 4.7 kilobaz (kb) dır. AAV'nin 9 serotipi mevcuttur. (AAV1-AAV9). Bunlar içinde en güvenilir olan ve retinal pigment epitel (RPE) hücrelerine en iyi uyum sağlayan vektör AVV2'dir.<sup>13</sup>

### NON VİRAL VEKTÖRLER:

Virüslerden daha güvenli ve kapasitesi daha büyük vektör arayışı sonucunda nonviral faktörler bulunmuştur. Bunlar arasında lipozomlar en çok çalışılanlardır. Ancak gen tedavisinde kültür çalışmaları çok efektif bulunmamıştır. Vektör kapasitesi ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda geliştirilen DNA nanopartikülleri ile kapasite probleminin düzeltilebileceği düşünülmektedir. DNA nanopartiküllerin kapasitesi 20 kb 'dir. Bu vektörle, çalışmalardaki en büyük gen olan Tıp 2A Usher sendromundan sorumlu 15.6 kb büyüklüğündeki Usherin genini taşıyabilmektedir. Bu partiküllerin akciğerde güvenli olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Retinada kullanımının güvenilirliği konusunda yapılan hayvan çalışmaları da iyi sonuçlar vermiştir. Ancak retinal hücrelere uyumu AVV kadar iyi değildir, bu nedenle tekrarlayan subretinal enjeksiyonlar gerektirebilir.<sup>14, 15</sup>

### GEN TEDAVİSİNİN UYGULANMASI

Mutasyonlu genin yüklendiği AAV'nin enjeksiyonu subretinal alana yapılır. Standart bir vitrektomi cerrahisi sonrasında subretinal kanül kullanılarak vektör subretinal alana yaklaşık olarak 0.1 mililitre sıvı içinde uygulanır.

## GEN TEDAVİSİNİN UYGULANDIĞI HASTALIKLAR

### LEBER'İN KONJENİTAL KÖRLÜĞÜ (LKK):

LKK, çok ağır seyreden konjenital bir retina hastalığıdır ve günümüzde gen tedavisi konusunda oftalmolojide en çok çalışma yapılan hastalıktır. Olgularda fundus bulgularının yanında bozulmuş ışık refleksi, ERG'de kayıt alınamayacak derecede belirgin azalma ve nistagmus mevcuttur. Görme kaybı doğumla ya da hayatın ilk birkaç yılında başlar ve erken erişkinlik döneminde total körlükle sonuçlanır. LKK'da pek çok gende mutasyon saptanmıştır Günümüze dek bildirilen 20 gen mevcuttur. Bu mutasyonlardan birisi olan RPE65 (Retina pigment epiteline spesifik protein 65 kDa), RPE hücrelerinde eksprese edilir ve all-trans retinil esterinin 11-cis retinale dönüşümünü sağlayan izomerohidrolazı kodlar. 11-cis retinil olmadan opsiner ışığı yakalayıp elektriksel uyarıya çeviremez. RPE65 kaybı görme siklusunu bozarak RPE hücrelerinde lipit damlacıkları içinde retinil ester birikimine, lipofuksin granüllerinde artışa oluşur. Sonuçta progresif bir retinal dejenerasyon ve görme kaybı oluşur.

Bu hastalıkdaki gen tedavisi ile ilgili klinik çalışmalar RPE65 mutasyonuna yöneliktir.<sup>16, 17</sup>

RPE65 gen mutasyonu olan farelerde bu geni taşıyan AAV vektör uygulaması hastalığın evresinden bağımsız olarak RPE transdüksiyonunu artırır. Enjekte edilen RPE65'in 7 ay sonra bile immunohistokimyasal olarak saptanabildiği görülmüştür. Tedavi edilen farelerde retina normal morfoloji göstermiş, retinil ester ve rodopsin seviyeleri normal olarak saptanmıştır. Görme keskinliklerinde belirgin artış görülmüştür.<sup>18</sup>

LKK'lı köpeklerde tek enjeksiyonla gen tedavisinin etkili olduğu görme fonksiyonunun düzeldiği gösterilmiştir. Enjeksiyondan 2 hafta sonra görme iyileşmesi başlamış, 3 ayda pik yapmış ve 7 yıla dek devam etmiştir. RPE65 defektli farklı köpek modellerinde yapılan çalışmalarda uzun vadede devam eden, görme düzeylerinde ve ERG bulgularında da iyileşmeye neden olan sonuçlar elde edilmiştir.<sup>19, 20</sup>

Hayvan deneylerinde elde edilen cesaret verici sonuçlardan sonra 2007 yılında RPE65-LKK klinik çalışmaları başlamıştır. Yapılan klinik çalışmalarda AAV2-RPE65 gen replasman tedavisi toksisitesi olmayan, cerrahi ve immunolojik olarak güvenli bir tedavi olarak bildirilmiştir. Görme keskinliklerindeki kazanç değişkenlik gösterir. Bu durum hastalığın çok ağır görme kaybı yapması ile ilişkilidir. Günümüze dek yayınlanmış en uzun takip süreli çalışma 3 yıllık takip sonuçlarını içermektedir. En iyi sonuçlar retinal yanıtları daha iyi olan genç hastalarda alınmıştır. 5 olgunun 3 yıllık takiplerinin sunulduğu bir klinik çalışmada tedaviden birkaç ay sonra görme fonksiyonları ve retina fonksiyonlarında düzelme saptanmış ve bu düzelme 3 yıl boyunca korunmuştur. Tedavi edilen olgularda ayrıca nistagmus sıklığında azalma, mf ERG yanıtlarında artış ve mikropereimetricde fiksasyon stabilitesinde iyileşme saptanmıştır.<sup>21, 22</sup>

Bainridge ve ark. tarafından yapılan 12 olguluk faz 1/2 çalışmada RPE65 geni taşıyan rAAV2/2 uygulaması sonrası 3 yıllık takip sonuçları sunulmuştur. Olgularda retinal sensitivite de artışlar saptanırken ERG bulgularında anlamlı farklar bulunmamıştır. Üç olguda intraokuler inflamasyon saptanırken, 2 olguda görme keskinliğinde bozulma meydana gelmiştir.<sup>23</sup> Başka bir faz I çalışmada 15 olgunun 3 yıllık takipleri sonrasında sistemik toksisiteye rastlanmamış, tüm olgularda görme keskinlikleri değişik seviyelerde artış göstermiştir. Kon ve rod hassasiyetleri tedavi alan gözlerde artarken, diğer gözde herhangi bir değişiklik görülmemiştir.<sup>24</sup>

Spark Therapeutics Biyoteknoloji firması AAV2/2-RPE65 gen tedavisinin uygulandığı 3 yaş civarında hastaların da dahil edildiği Faz III çalışması devam etmektedir (NCT00999609). Bu çalışmanın sonuçları 2017 de elde edilecek ve sonuçlara göre FDA onayı için girişimler başlatılacaktır. LKK de yapılan klinik çalışmalarda elde edilen ümit verici sonuçlar diğer HRD'de de gen tedavisi uygulamaları için yol açmıştır.

### RETİNİTİS PİGMENTOSA (RP):

RP pek çok gende çok sayıda mutasyonla giden bir grup hastalıktan oluşur. Rodopsin visual transdüksiyon döngüsünü başlatan pigmenttir. Bu döngü aydınlıkta ve alacakaranlıkta

görmemizi sağlar. Rodopsin genindeki mutasyon fotoreseptörlerde progresif kayba ve görme keskinliğinde progresif azalmaya neden olacaktır. RP olgularında gen mutasyonlarının saptanmasından sonra bu hastalarda gen tedavisi ile ilgili çalışmalar başlatılmıştır. RP'de gen tedavisinde iki türlü yaklaşım söz konusudur. İlk yaklaşım etkilenen genin sağlam bir kopyasını AAV üzerine yükleyerek retina altına enjekte etmektir. İkinci yaklaşım ise mutasyonlu genin inaktive edilmesidir. RP'de saptanan ilk mutasyon rodopsin (RHO) gen mutasyonudur. Tedavi için denenen ilk yaklaşım defektli RHO geninin fonksiyonunu arttırmak için proteozomal degradasyonunu hızlandırmaktır. Ancak bu yöntem günümüze dek yapılan hayvan deneylerinde başarıya ulaşmamıştır. Başka bir alternatif ribonükleik asite (RNA) yönelik tedavidir. Ribozomlar kullanılarak spesifik mRNA'nın selektif destrüksiyonu ile gendeki mutasyonlu allel etkisiz hale getirmeye çalışılır.<sup>25</sup> Bu yöntemle OD-RP'de başarı sağlansa da RHO geninde 120 değişik mutasyonun saptanmış olması, bu mutasyonların hepsinin test edilmesini ve tedavi amacıyla dizaynlar yapılmasını ekonomik olarak ve teknik olarak zorlaştırmaktadır.

Nagatsu ve ark.<sup>26</sup> OR-RP olgularında cGMP fosfodiesteraz (PDE) genindeki mutasyonun tedavisi için rAAV kullanmışlardır. Sağlam PDE'nin fare modelinde intraokuler olarak uygulanması retinal fonksiyonları korumuş ve fotoreseptör dejenerasyonunu engellemiştir. Son yıllarda X'e bağlı RP'de de gen tedavisi konusunda gelişmeler olmuştur. X'e bağlı RP olgularında pek çok olguda RPGR Regulator geninde (RPGR) mutasyon saptanmıştır. RPGR geni X kromozomu üzerinde bulunur. Köpek modellerinde RPGR geni yüklü AAV'nin subretinal uygulaması sonrası retinal dejenerasyonun durduğu gösterilmiştir.<sup>27</sup>

RP tip 38 de bulunan ve RPE'de eksprese edilen MERTK gen mutasyonu ile ilgili de gen çalışmaları bulunmaktadır. Farelerde yapılan bir çalışmada MERTK geni taşıyan AAV2 vektörünün subretinal uygulaması fotoreseptör dejenerasyonunu engellemiştir.<sup>28</sup> Benzer deneysel sonuçlar sonrasında insanlar üzerinde klinik çalışmalar başlatılmıştır.

### STARGARDT MAKULA DİSTROFİSİ (SMD):

SMD, ATP binding cassette subfamily A member 4 (ABCA4; ABCR) geninde mutasyonla oluşan bir retinal dejenerasyondur. ABCA4 geni enerjinin fotoreseptörlerden iletimini sağlayan proteini kodlar. Bu gendeki mutasyon fotoreseptör dejenerasyonuna ve takiben görme kaybına neden olur. Farelerde yapılan gen tedavisi denemeleri oldukça cesaret verici sonuçlar vermiştir. Naash ve ark. SMD'li farelere nanopartikülleri kullanarak normal ABCA4 genini uygulamıştır. Bu uygulama görmeyi korumasını sağlamıştır.<sup>29</sup> Bu sonuçlar insanlarda da çalışmaların başlatılmasına yol açmıştır. SMD'de saptanan ABCA4 gen mutasyonuna yönelik klinik çalışma devam etmektedir. (STGD1; NCT01367444).<sup>30</sup>

### YAŞA BAĞLI MAKULA DEJENERASYONU (YBMD):

YBMD'de CD59 kullanılarak yapılan gen tedavisi hastalığın seyrini yavaşlatabilmektedir. Gen tedavisi yoluyla uygulanacak CD59 kan damarlarında meydana gelen kontrolsüz büyümeyi önleyebilmektedir. CD59, YBMD nedenlerinden biri olarak düşünülen membran atak kompleksi (MAK) oluşumunu % 62 oranında azaltmaktadır.<sup>31</sup>

Çözünabilir fms-benzeri tirozin kinaz-1 (sFlt-1 ya da sVEGFR-1) bir tirozin kinaz proteinidir ve damar büyümesine yol açan proteinleri inaktive eder. 2011 yılında yaş tip YBMD'de subretinal rAAV s Flt-1 uygulamasının yapıldığı bir klinik çalışma başlatılmıştır.

9 olgunun (6 olgu çalışma grubu, 3 olgu kontrol) dahil edildiği bu çalışmada ilaçla ilişkili bir yan etkiye rastlanmamıştır. Çalışma grubunun olgularının 4'ü tedaviye iyi yanıt vermiştir ve bu tedavinin güvenli olduğu ve yaş tip YBMD tedavisinde potansiyel bir tedavi olabileceği bildirilmiştir.<sup>32</sup>

### KOROİDEREMİ:

Koroïderemi X'e bağlı geçiş gösteren progresif retinal dejenerasyonla seyreden bir retina hastalığıdır. Etkilenen erkek bireylerde gece görmeye azalma, periferik görme kaybı, ve altıncı dekatta total görme kaybı ile seyreder. Bu hastalıkta koroïderemi (CHM) geninde mutasyon saptanmıştır. Preklinik

çalışmalarda elde edilen cesaret verici sonuçlar sonrasında planlanan bir klinik çalışmada sağlam CHM geni vektör ile (AAV-REP1) subretinal alana enjekte edilmiştir. Altı olgunun 2'sinde erken dönemde görme artışı görülmüştür. 3.5 yıl sonunda tedavi edilen gözlerde elde edilen görme artışı 21 harf (4 sıra) olarak belirlenirken, tedavi edilmeyen diğer gözde 18 harf görme azalması meydana gelmiştir.<sup>33</sup>

**SONUÇ:** Gen tedavisi ile ilgili ilk sonuçlar iyi olsa da bazı soruların cevabı henüz bilinmemektedir. Viral vektörler gen taşımada diğer vektörlerden daha etkilidir. AVV2, RPE hücrelerine çok iyi uyum göstermesine rağmen yeni vektörler üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Çünkü RPE dışında diğer retinal hücrelerle uyum sağlayacak özellikle de fotoreseptörlerle uyum sağlayacak yeni vektörlere ihtiyaç vardır. Ayrıca AVV2'nin mevcut kapasitesi 4.7 kb dır ve bu kapasite daha büyük genlerin tedavi edilmesi için yeterli değildir. Vektör kapasitesi ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda geliştirilen non-viral vektörler ile hedeflenen genlerin sayısı arttırılmıştır ve LKK de CEP290, SMD'de ABCA4, ve Tip 1 Usher sendromunda MYO7A gibi genler de şu anda kapasite dahilindedir. Ancak yine de USH2A gibi daha büyük genler hala mevcut kapasiteyi aşmaktadır. Bu problemi aşabilmek için alternatif tedaviler üzerinde çalışılmakta ve DNA nanopartikülleri ile bu problemin düzeltilebileceği düşünülmektedir.

## RETİNA HASTALIKLARINDA KÖK HÜCRE TEDAVİSİ

### KÖK HÜCRE NEDİR:

Kök hücre, işlevsel olarak farklılaşmamış, tam olarak olgunlaşmamış karmaşık bir yapısı olan öncül bir hücredir. Bu öncül hücre bedenin başka hücrelerine dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Kök hücreler kendiliklerinden uygun bir büyüme ortamına yerleşebilirler; çoğalabilirler, başka tür hücrelere farklılaşmış bu türün devamı niteliğinde türler üretebilirler; kendilerini yenileyebilir veya kendi hücre topluluklarının devamlılığını sağlayabilirler. Ayrıca vücudun bir yerindeki zedelenmeyi takiben bu dokuyu onarabilme ve onu işlevsel hale getirebilme potansiyeline sahiptirler. Bu potansiyelleri nedeniyle retinadaki hasarlı hücrelerin yerini alabilecekleri ya da

o hücreleri onarabilecekleri düşünülmektedir. Bu potansiyelleri kök hücrelerin pek çok hastalıkta tedavi seçeneği olarak araştırılmasına yol açmıştır.<sup>34, 35</sup>

### **KÖK HÜCRELERİN ÖZELLİKLERİ:**

**Proliferasyon:** Kök hücreler uzun süreler boyunca bölünebilme ve çoğalabilme yeteneğine sahiptir.

**Self –renewal (Kendi kendini yenileyebilme):** Bölünme sonrası hücre önceki hücre gibi kök hücre olabilme özelliğini devam ettirir.

**Differensiasyon:** Özelleşmemiş kök hücre özelleşmiş bir kök hücreye dönüşebilir. Differansiasyon süresinde internal ve eksternal uyaranlar önemlidir. İnternal uyaranlar hücrenin genleri tarafından kontrol edilir. Eksternal uyaranlar ise ortamdaki diğer hücreler tarafından salgılanan kimyasal faktörler, komşu hücrelerle olan fiziksel temas ve ortamda bulunan diğer moleküller tarafından düzenlenir.<sup>34, 35</sup>

### **KÖK HÜCRENİN TARİHÇESİ:**

1981: Fare embriyosundan embriyonik kök hücre elde edilmesi

1998: Laboratuvar şartlarında insan embriyosundan kök human embryonic stem cell (hESC) hücre elde edilmesi

2006: erişkin hücrelerin tekrar programlanarak embriyonik kök hücre gibi davranmasının sağlanması ve 'indüklenmiş pluripotent kök hücre'(induced pluripotent stem cells: iPSCs) elde edilmesi

2009: FDA onayı ile hESC in insanda spinal kord yaralanmasında ilk klinik kullanımı gerçekleştirilmiştir.<sup>36</sup>

### **KÖK HÜCRE TİPLERİ VE ELDE EDİLİŞİ:**

- 1- **EMBRYONİK KÖK HÜCRELER (EKH):** Erken embriyonik dönemde alınan hücrelerden laboratuvar şartlarında elde edilir.
- 2- **YETİŞKİN KÖK HÜCRELER**
  - Mesenkimal Kök Hücre (MKH): Erişkinden alınan kan, deri, diş, kemik iliği, yağ, kıkırdak gibi hücrelerden la-

baratuvar şartlarında elde edilir. En çok yağ ve kemik iliğinden üretilen MKH kullanılır.

- **İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre (İPKH):** Erişkinden alınan hücrelerin laboratuvar şartlarında yeniden programlanarak EKH özelliklerini gösteren hücre şekline dönüştürülmesiyle elde edilir.

**3-KORDON KANI KÖK HÜCRESİ:** Doğum sırasında kordon kanından alınan hücrelerden laboratuvar şartlarında elde edilir.

**4-AMNİOTİK SIVI KÖK HÜCRESİ:** Amnion sıvısından alınan hücrelerden laboratuvar şartlarında elde edilir.<sup>36</sup>

### **KÖK HÜCRENİN ETKİ MEKANİZMALARI:**

- 1- **Hücre replasmanı:** Sağlıklı kök hücreler dejenere sağlıklı kök hücrelerin yerini alabilir.
- 2- **Nutrisyonel destek:** Sağlıklı kök hücreler büyüme faktörleri salgılayarak çevresindeki hücrelerin yaşam desteklerini artırır.
- 3- **Anti-apoptozis:** Retinal hücrelerin ve damarların dejenerasyonunu antiapoptotik etkiyle düzenlemek.
- 4- **Sinaps oluşumu:** Yeni sinaptik bağlantılar sağlamak.<sup>36, 37</sup>

### **RETİNA HASTALIKLARINDA KÖK HÜCRE ÇALIŞMALARI:**

Kök hücre tedavisinin uygulanması açısından gözün çok sayıda avantajı mevcuttur. Uygulama için gereken kök hücre miktarı oldukça azdır, cerrahi olarak yaklaşım oldukça kolaydır. Transplante edilen hücreler kolayca izlenebilir. Diğer göz kontrol olarak kullanılabilir. Gözün immun ayrıcalığından dolayı immunosupresif tedaviye ihtiyaç duyulmaz.

Yapılan deneysel çalışmalarda dejenere retinal hücrelerin yerine sağlıklı kök hücrelerin uygulanması, hücrelerin yenilenmesine, aralarında yeni bağlantılar oluşmasına ve görme fonksiyonunun gelişmesine yardımcı olmuştur.

Kök hücrelerin bulunduğu ortamdaki retinal nöral hücreler ve fotoreseptörler de dahil olmak üzere pek çok hücreye diffe-

rensiye olma potansiyeli vardır. Daha önce yapılan deneysel çalışmalarda kök hücrelerin retinaya çok iyi entegre olduğu, Müller, amakrin, bipolar, horizontal, glial hücrelere ve fotoreseptörlere adapte olabildiği gösterilmiştir.

Retinal hastalıklarda kök hücre olarak EKH'ler, MKH'ler (kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı) ve iPKH'ler kullanılır.<sup>34-37</sup>

Deneysel çalışmalarda elde edilen başarılı sonuçlardan sonra 2010 yılında insanlarda kök hücre klinik çalışmaları başlatılmıştır. 2012 yılında Schwartz ve ark. çalışmalarının ilk sonuçlarını yayınlamışlardır. Bu çalışmada bir kuru tip YBMD, bir SMD olgusunda subretinal hESC-derive RPE hücresi uygulaması yapılmış, 4 aylık takiplerde herhangi bir olumsuz proliferasyon, tümör oluşumu, ektoptik doku gelişimi ya da rejeksiyon bulgusuna rastlanmamıştır.<sup>38</sup>

Bu çalışmanın devamında 9 YBMD, 9 SMD olgusunun 22 aylık takip sonuçları sunulmuştur. En iyi düzeltilmiş görme keskinliği (EİDGK) 10 olguda artış gösterirken, 7 olguda aynı kalmış, 1 olguda ise 10 harften daha fazla görme kaybı gelişmiştir. Olguların tedavi almayan diğer gözlerinde herhangi bir iyileşme saptanmamıştır. Bu çalışma dejeneratif retina hastalıklarında kök hücre uygulamasının orta-uzun süreli sonuçlarını yayınlayan ilk çalışmadır.<sup>39</sup>

Son yıllarda yayınlanan başka bir klinik çalışmada iki kuru tip YBMD, iki SMD toplam 4 olguda hEKH kaynaklı RPE hücrelerinin subretinal alana kullanılması sonucunda elde edilen bulgular rapor edilmiştir. Bir yıllık takip sonucunda herhangi bir olumsuz yan etkiye rastlanmamıştır. Olguların 1 yıllık takip sonuçlarında güvenilirlik açısından olumsuz bir sonuç izlenmemiştir. Kontrolsüz proliferasyon, tümör gelişimi, ektoptik doku gelişimine rastlanmamıştır. 3 olguda görme keskinliği 9-19 harf artış gösterirken, bir olguda stabil seyretmiştir. Bu bulgular hEKH kaynaklı RPE hücrelerinin güvenli olduğunu göstermektedir.<sup>40</sup>

Prospektif faz I bir çalışmada 3 RP olgusu ve 2 kon-rod distrofi olgusuna tek doz intravitreal otolog kemik iliği kaynaklı MKH uygulanmış ve 10 aylık takip sonuçlarında retinada belirgin yapısal ve fonksiyonel toksisite izlenmemiştir Siqueira ve ark. olguların 4'ünde enjeksiyondan 1 hafta sonra EİDGK'de 1 sıra

artış olmuş ve bu artış takiplerde korunmuştur.<sup>41</sup> Bu çalışmanın devamında da 20 olguya intravitreal MKH uygulaması yapılmış ve olguların 1 yıllık takipleri sonuçlanmıştır. Bu olgularda görme ile ilişkili hayat kalitesi sorgulandığında, 3. ayda görme ile ilişkili hayat kalitesi skorunda istatistiksel anlamlı iyileşme olurken 12. Ayda bu skorların başlangıç değerlerine döndüğü belirtilmiştir. Dolayısıyla bu iyileşme bir süre sonra ortadan kalkmaktadır.<sup>42</sup>

Park ve ark.<sup>43</sup> tarafından yapılan başka bir çalışmada geri dönüşümsüz görme kaybı olan 6 göze (retinal vasküler hastalıklar, hereditör ya da noneksüdatif YBMD, RP ) 3.4 milyon intravitreal kemik iliği kaynaklı MKH enjekte edilmiştir. Bu tedavi iyi tolere edilmiş, intraokuler inflamasyon ya da proliferasyona rastlanmamış, 6 aylık takip sonrasında ERG ve EİDGK'de herhangi bir bozulma görülmemiştir.

Adipoz doku kaynaklı MKH uygulaması ile ilgili ilk bulgular kliniğimizden yapılan bir prospektif faz I çalışmada bildirilmiştir. Bu çalışmada herhangi bir sistemik yan etkiye rastlanmamıştır. 14 olguluk seride 5 olguda makula etrafında epiretinal membran gelişimi ve perifer retinada membran gelişimine bağlı lokalize traksiyonel dekolman gelişmiş ve bu olgulara tekrar vitrektomi uygulanması gerekmiştir. Bu komplikasyonun subretinal uygulanan KH'lerin vitreusa dağılmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bir olguda koroidal neovasküler membran gelişmiş ve tek doz anti-VEGF ile tedavi edilmiştir. Bu komplikasyonun da Bruch membranında oluşan cerrahi travmadan kaynaklandığı düşünülmüştür.<sup>44</sup>

## SONUÇ

**Kök hücre** uygulamaları ile ilgili bildirilen faz I/II çalışma sonuçları başarılıdır. Daha çok olgu içeren daha uzun süreli takip sonuçları olan çalışmalar bu tedavinin gelecekteki yerini belirleyecektir.

## KAYNAKLAR/REFERENCES

- 1- Ku CA, Pennesi ME. Retinal Gene Therapy: Current Progress and Future Prospects. *Expert Rev Ophthalmol.* 2015; 10: 281–299. doi:10.1586/17469899.2015.1035711.

- 2- Trapani I, Banfi S, Simonelli F, et al. Gene Therapy of Inherited Retinal Degenerations: Prospects and Challenges. *Human Gene Therapy*. 2015; 26:193–200. DOI: 10.1089/hum.2015.030.
- 3- Sahel JA, Marazova K, Audo I. Clinical characteristics and current therapies for inherited retinal degenerations. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014;5:pii: a017111.
- 4- Berger W, Kloeckener-Gruissem B, Neidhardt J. The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res* 2010;29:335–375.
- 5- Dalkara D, Sahel JA. Gene therapy for inherited retinal degenerations. *C R Biol* 2014;337:185–192.
- 6- Trapani I, Puppo A, Auricchio A. Vector platforms for gene therapy of inherited retinopathies. *Prog Retin Eye Res* 2014;43:108–128.
- 7- Sahel JA, Roska B. Gene therapy for blindness. *Annu Rev Neurosci* 2013;36:467–488.
- 8- Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS. Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol*. 2007; 125(2):151–158. [PubMed: 17296890]
- 9- Liu MM, Tuo J, Chan CC. Gene therapy for ocular diseases. *Br J Ophthalmol* . 2011; 95(5): 604–612. doi:10.1136/bjo.2009.174912.
- 10- Friedmann T. A brief history of gene therapy. *Nat Genet*. 1992; 2:93–8. [PubMed: 1303270]
- 11- Cao H, Molday RS, Hu J. Gene therapy: light is finally in the tunnel. *Protein Cell* 2011, 2(12): 973–989 DOI 10.1007/s13238-011-1126-y
- 12- Benihoud, K., Yeh, P., and Perricaudet, M. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol*. 1999;10, 440–447.
- 13- Hirsch, M.L., Agbandje-McKenna, M., and Samulski, R.J. Little vector, big gene transduction: fragmented genome reassembly of adeno-associated virus. *Mol Ther*. 2010; 18, 6–8.
- 14- Ziady AG, Gedeon CR, Muhammad O, et al. Minimal toxicity of stabilized compacted DNA nanoparticles in the murine lung. *Mol Ther*. 2003; 8(6):948–956. [PubMed: 14664797]
- 15- Han Z, Conley SM, Makkia R, et al. Comparative analysis of DNA nanoparticles and AAVs for ocular gene delivery. *PLoS One*. 2012; 7(12):e52189. [PubMed: 23272225]
- 16- Cai X, Conley SM, Naash MI. RPE65: role in the visual cycle, human retinal disease, and gene therapy. *Ophthalmic Genet* 2009;30(2):57.
- 17- Li X, Li W, Dai X, et al. Gene therapy rescues cone structure and function in the 3-month-old rd12 mouse: a model for midcourse RPE65 leber congenital amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 5;52(1):7-15. doi: 10.1167/iovs.10-6138.
- 18- Bencicelli J, Wright JF, Komaromy A, et al. Reversal of blindness in animal models of leber congenital amaurosis using optimized AAV2-mediated gene transfer. *Mol Ther*. 2008; 16(3):458–465. [PubMed: 18209734]
- 19- Acland GM, Aguirre GD, Ray J, et al Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness.. *Nat Genet*. 2001; 28(1):92-5
- 20- Acland GM, Aguirre GD, Bennett J, et al. Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Mol Ther*. 2005; 12(6):1072–1082. [PubMed: 16226919]
- 21- Simonelli F, Maguire AM, Testa F, et al. Gene therapy for Leber’s congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. *Mol. Ther*. 2010; 18:643–650. [PubMed: 19953081]
- 22- 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(6): 1283–1291. doi:10.1016/j.ophtha.2012.11.048
- 23- Bainbridge JWB, Mehat MS, Sundaram V et al. Long-Term Effect of Gene Therapy on Leber’s Congenital Amaurosis. *N Engl J Med*. 2015; 372(20): 1887–1897. doi:10.1056/NEJMoa1414221
- 24- Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R, et al. Gene Therapy for Leber Congenital Amaurosis caused by RPE65 mutations: Safety and Efficacy in Fifteen Children and Adults Followed up to Three Years. *Arch Ophthalmol*. 2012 ; 130(1): 9–24. doi:10.1001/archophthalmol.2011.298.
- 25- Hauswirth WW, Lewin AS. Ribozyme uses in retinal gene therapy. *Prog Retin Eye Res*. 2000;19(6):689–710.
- 26- Nagatsu T, Parvez SH, Bertolotti Roger. Progress in gene therapy: basic and clinical frontiers . Leiden:VSP;2000.
- 27- Hays, Dustin C. Canine study puts gene therapy for X-linked retinitis pigmentosa in sight. National Eye Institute. <<http://www.nei.nih.gov>>; 28.06.12. 12. Ghosh, Pallab. Gene
- 28- LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, et al. Gene Therapy for MERTK-Associated Retinal Degenerations *Adv Exp Med Biol*. 2016; 854: 487–493. doi:10.1007/978-3-319-17121-0\_65.



- 29- Naash, Muna. Nanoparticle-based gene therapy preserves vision in lab study for Stargardt disease. Foundation Fighting Blindness. Web: <<http://www.blindness.org>>; 22.07.12.
- 30- Parker MA, Choi D, Erker LR, et al. Test-Retest Variability of Functional and Structural Parameters in Patients with Stargardt Disease Participating in the SAR422459 Gene Therapy Trial. *Transl Vis Sci Technol.* 2016;5(5):10. PubMed PMID: 27730010; PubMed Central PMCID: PMC5054761.
- 31- Gullagher S, Tufts. Gene therapy shows promise against age-related macular degeneration. April 29, 2011. Web: <<http://now.tufts.edu>>; 11.05.12.
- 32- Rakoczy EP, Lai CM, 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(10011):2395-403. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00345-1. Epub 2015 Sep 30.
- 33- 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.
- 34- Zarbin M. Cell-Based Therapy for Degenerative Retinal Disease. *Trends Mol Med.* 2016;22(2):115-34. doi: 10.1016/j.molmed.2015.12.007. Epub 2016 Jan 11.
- 35- Shintani K, Shechtman DL, Gurwood AS. Review and update: Current treatment trends for patients with retinitis pigmentosa. *Optometry* 2009; 80, 384-401.
- 36- Bennicelli J, Bennett J. Stem cells set their sights on retinitis pigmentosa. *eLife* 2013;2:e01291. DOI: 10.7554/eLife.01291.
- 37- Siqueira RC. Stem cell therapy for retinal diseases: update. *Stem Cell Res Ther.* 2011;2:50.
- 38- Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, Mickunas E, Gay R, Klimanskaya I, Lanza R. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* 2012;379:713-20. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60028-2. Epub 2012 Jan 24.
- 39- Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, Elliott D, Rosenfeld PJ, Gregori NZ, Hubschman JP, Davis JL, Heilwell G, Spirn M, Maguire J, Gay R, Bateman J, Ostrick RM, Morris D, Vincent M, Anglade E, Del Priore LV, Lanza R. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet.* 2015;385:509-16. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61376-3. Epub 2014 Oct 15
- 40- Song WK, Park KM, Kim HJ, Lee JH, Choi J, Chong SY, Shim SH, Del Priore LV, Lanza R. Treatment of macular degeneration using embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium: preliminary results in Asian patients. *Stem Cell Reports.* 2015;4(5):860-72. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.04.005. Epub 2015 Apr 30.
- 41- Siqueira RC, Messias A, Voltarelli JC, Scott IU, Jorge R. Intravitreal injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells for hereditary retinal dystrophy: a phase I trial. *Retina.* 2011;31:1207-14. doi: 10.1097/IAE.0b013e3181f9c242.
- 42- Siqueira RC, Messias A, Messias K, Arcieri RS, Ruiz MA, Souza NF, Martins LC, Jorge R. Reticell 2014. Quality of life in patients with retinitis pigmentosa submitted to intravitreal use of bone marrow-derived stem cells (Reticell -clinical trial) *Stem Cell Research & Therapy* 2015; 6:29 DOI 10.1186/s13287-015-0020-6.
- 43- Park SS, Bauer G, Abedi M, Pontow S, Panorgias A, Jonnal R, Zawadzki RJ, Werner JS, Nolta J. Intravitreal autologous bone marrow CD34+ cell therapy for ischemic and degenerative retinal disorders: preliminary phase 1 clinical trial findings. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;56:81-89. DOI:10.1167/iovs.14-15415
- 44- Oner A, Gonen ZB, Sinim N, Cetin M, Ozkul Y. Subretinal adipose tissue-derived mesenchymal stem cell implantation in advanced stage retinitis pigmentosa: a phase I clinical safety study. *Stem Cell Res Ther.* 2016 Dec 1;7(1):178.