

(12)

# Badania eksperymentalne nad farmakologicznymi metodami leczenia chorób dystroficznych siatkówki ze szczególnym uwzględnieniem retinopatii *ABCA4*

*Experimental studies on medical treatments of retinal dystrophies with a particular focus on ABCA4 retinopathies*

Aneta Ścieżyńska<sup>1</sup>, Dominika Oziębło<sup>2</sup>, Monika Ołdak<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Centrum Biostruktury, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Kierownik: prof. dr hab. Jacek Malejczyk

<sup>2</sup> Zakład Genetyki, Instytut Fizjologii i Patologii Słuchu w Warszawie

Kierownik: dr hab. n. med. Monika Ołdak

<sup>3</sup> Samodzielny Publiczny Kliniczny Szpital Okulistyczny w Warszawie

## Streszczenie:

Choroby dystroficzne siatkówki są uwarunkowaną genetycznie grupą chorób zróżnicowaną zarówno pod względem klinicznym, jak i etiologicznym. Najczęstszą centralną dystrofią siatkówki jest choroba Stargardta, która głównie jest powodowana mutacjami w genie *ABCA4*. Dysfunkcja produktu białkowego genu *ABCA4* prowadzi do kumulacji toksycznych metabolitów cyklu wzrokowego, a w konsekwencji utraty fotoreceptorów i otaczających je komórek nabłonka barwnikowego siatkówki. W niniejszej pracy zostały zebrane różne próby postępowania farmakologicznego, które mają na celu spowolnienie progresji chorób dystroficznych siatkówki ze szczególnym uwzględnieniem retinopatii *ABCA4*.

## Słowa kluczowe:

gen *ABCA4*, choroba Stargardta, dystrofia siatkówki, metody farmakologiczne, ramiprylat, dobesylan, florogluцина.

## Summary:

Retinal dystrophies are a group of hereditary diseases varying in clinical and etiological aspects. The most common central retinal dystrophy is Stargardt's disease, which is mainly caused by mutations in the *ABCA4* gene. Dysfunction of the *ABCA4* gene product leads to accumulation of toxic metabolites of the visual cycle and consequently to the loss of photoreceptors and surrounding retinal pigment epithelial cells. This study summarizes various pharmacological attempts aimed at slowing the progression of retinal dystrophies, especially *ABCA4* retinopathies.

## Key words:

*ABCA4* gene, Stargardt disease, retinal dystrophies, ramiprilat, dobesilate, phloroglucinol.

## 1. Wstęp

Dziedziczne dystrofie siatkówki są dużą grupą chorób o podłożu genetycznym, zróżnicowaną pod względem klinicznym oraz etiologicznym. W zależności od umiejscowienia zmian wyróżniamy dystrofie, w przebiegu których najpierw choroba obejmuje pręciki, w innych – centralną część siatkówki, w jeszcze innych – komórki czopkonośne. Najczęściej jednak dysfunkcja dotyczy zarówno komórek czopkonośnych, jak i pręcikonośnych. Wspólną cechą chorób dystroficznych siatkówki jest postępujące ograniczenie obszaru pola widzenia i/lub ostrości wzroku (1, 2). Bardzo ważną rolę w patogenezie chorób siatkówki odgrywa gen *ABCA4*. Gen *ABCA4* należy do nadrodziny genów ABC (ang. „ABC” – ATP Binding Cassette) kodujących białka posiadające domenę wiążącą ATP (3). Jest to obszerna grupa białek specjalizujących się w selektywnym transporcie substancji przez błonę komórkową z wykorzystaniem energii uzyskanej z hydrolizy cząsteczki ATP. Gen *ABCA4* jest bardzo heterogenny i dotychczas zidentyfikowano około 800 różnych jego mutacji. Patogenne warianty mogą prowadzić do powstania

m.in. choroby Stargardta, dna żółtoplamistego, części dystrofii czopkowo-pręcikowych, niektórych przypadków zwyrodnienia barwnikowego siatkówki (ang. Retinitis Pigmentosa – RP), ale również form pośrednich ww. fenotypów, które są mniej charakterystyczne klinicznie (4). Choroby dystroficzne siatkówki, których przyczyną molekularną jest dysfunkcja genu *ABCA4*, są określane również jako „retinopatie *ABCA4*”.

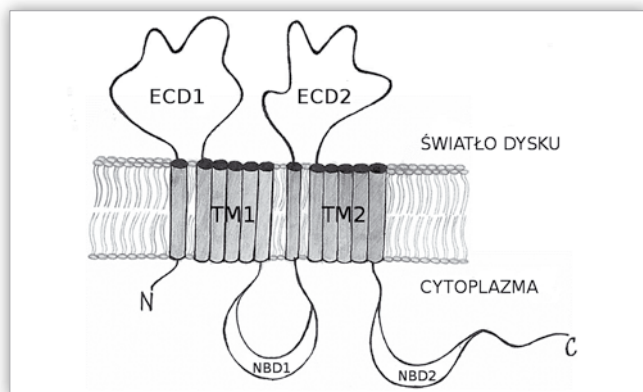
## 2. Gen *ABCA4* w dziedzicznych chorobach siatkówki

Pomimo znacznych różnic klinicznych wspólną cechą retinopatii *ABCA4* jest postępująca i nieodwracalna utrata wzroku z początkiem choroby jeszcze w dzieciństwie lub u młodych dorosłych. Ta grupa chorób siatkówki dziedziczy się jak cechy autosomalne recesywne. Do ich wystąpienia niezbędne są przynajmniej dwie mutacje genu *ABCA4* uszkadzające obie kopie tego genu. Częstość nosicielstwa mutacji w genie *ABCA4* w ogólnej populacji szacuje się bardzo wysoko, między 1/10–1/20 (5), a według naszych badań w populacji polskiej wartość ta wynosi około 4% (6).

Mutacje genu *ABCA4* mogą w różnym stopniu upośledzać funkcję kodowanego przez niego transportera ABCA4. Doprowadziło to do wyróżnienia tzw. łagodnych, umiarkowanych i ciężkich mutacji genu *ABCA4*. Różne typy mutacji genu *ABCA4* u pacjentów prowadzą do występowania zróżnicowanych fenotypów „retinopatii ABCA4”. Podejrzewa się, że dwie ciężkie mutacje *ABCA4* prowadzące do całkowitej utraty aktywności białka będą manifestowały się pod postacią zwyrodnienia barwnikowego siatkówki. Jedna ciężka i jedna umiarkowana mutacja dają minimalną aktywność białka i prowadzą do powstania dystrofii czopkowo-pręcikowej. Natomiast pacjenci z jedną ciężką i jedną łagodną lub dwiema umiarkowanymi mutacjami rozwijają chorobę Stargarda. Należy jednak zaznaczyć, że prawdopodobnie na efekt fenotypowy mutacji wpływają dodatkowo również inne czynniki genetyczne (poza *ABCA4*) i/lub środowiskowe, ponieważ zdarza się, że pacjenci z jednakowymi mutacjami *ABCA4* mają odmienne zarówno przebieg choroby, jak i rozpoznanie kliniczne (6–7). Zgodnie z tym modelem postuluje się również, że u pacjentów z łagodnymi mutacjami genu *ABCA4* podwyższone jest ryzyko rozwoju zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (ang. Age-related Macular Degeneration – AMD) (8).

### 3. Mechanizm działania transportera ABCA4 w fotoreceptorach

Ekspresja genu *ABCA4* w gałce ocznej jest ograniczona do zewnętrznych segmentów fotoreceptorów, dokładniej ich dysków (9). Pojedyncze dyski pręcików są od siebie izolowane dwuwarstwą lipidową i nie mają łączności z rzęską (ang. cilium). Wszystkie dyski są otoczone wspólną błoną zewnętrznego segmentu pręcika. Dyski czopków natomiast nie są odizolowanymi strukturami, lecz zachowują połączenie z cilium, którego rozmiar sięga całej długości zewnętrznego segmentu czopka (10). Białko ABCA4 jest umiejscowione w błonie dysków fotoreceptorów. Transporter ABCA4 składa się z: (i) dwóch domen transbłonowych, (ii) dwóch domen wiążących ATP, które zapewniają energię potrzebną do transportu aktywnej substancji przez błonę komórkową, a także (iii) dwóch pozabłonowych domen leżących w zewnętrznej części dysków fotoreceptorów, których znaczenie wciąż jeszcze nie zostało do końca poznane (9) (ryc. 1.).



Ryc. 1. Topologia ABCA4. Zaznaczono dwie domeny transbłonowe (TM1 i TM2), dwie glikozylowane domeny zewnątrzkomórkowe (ECD1 i ECD2) i dwie wewnętrzne domeny wiążące nukleotydy (NBD1 i NBD2).

Fig. 1. ABCA4 topology. Shown are two transmembrane domains (TM1 and TM2), two glycosylated extracellular domains (ECD1 and ECD2) and two internal nucleotide-binding domains (NBD1 and NBD2).

Uważa się, że transporter ABCA4 funkcjonuje jako flipaza aktywnie przenosząca powstający w cyklu wzrokowym produkt świetlnego rozpadu rodopsyny – all-trans retinal – przez błonę komórkową dysku fotoreceptora. To działanie jest niezwykle ważne dla zachowania ciągłości cyklu wzrokowego, ponieważ all-trans retinal uwolniony z zaindukowanej światłem rodopsyny (połączenie białka opsyny z kofaktorem 11-cis-retinalem) musi zostać przetransportowany z wnętrza dysku fotoreceptorów do komórek nabłonka barwnikowego siatkówki (ang. Retinal Pigment Epithelium – RPE), w których zostanie enzymatycznie przekształcony do izomeru 11-cis. Ten związek ponownie przedostanie się do fotoreceptorów i będzie służył do odbudowania rodopsyny (9).

Retinale są związkami hydrofobowymi, które mogą swobodnie przenikać przez błonę plazmatyczną dysku fotoreceptora. W obecności fosfolipidu błonowego – fosfatydyloetanolaminy (PE), retinale wiążą się spontanicznie i odwracalnie, tworząc N-retynylieno-fosfatydyloetanolaminę (N-retynylieno-PE). Ten związek nie może już swobodnie przenikać w poprzek błony komórkowej (11–13). Podejrzewa się, że transporter ABCA4 aktywnie importuje N-retynylieno-PE oraz PE ze światła dysku fotoreceptora do jego części cytoplazmatycznej. Według tego założenia działanie transportera jest przeciwne do działania innych białek z rodziny transporterów ABC, które transportują substraty poza komórkę. Badania wykazały, że ABCA4 ma wysokie powinowactwo do N-retynylieno-PE wobec niskiego stężenia ATP. Zwiążanie cząsteczki ATP indukuje zmiany konformacyjne białka ABCA4, obniżając powinowactwo do substratu i uwalniając tym samym związek po stronie cytoplazmatycznej dysku fotoreceptora. Hydroliza ATP przywraca wyjściową konformację transportera ABCA4 i inicjuje rozpoczęcie kolejnego cyklu (13).

Teorię odmienną do powyżej opisanej przedstawili Boyer i wsp. Przeprowadzone przez nich badania nie dostarczają bezpośrednich dowodów potwierdzających, jaki jest kierunek transportu substratu, sugerują jednak, że transporter ABCA4 przenosi substrat z cytoplazmy komórki do światła dysku. Założenie to jest przeciwne do wcześniej opisanego założenia modelu działania ABCA4, jest jednak zgodne z mechanizmem transportu innych białek z rodziny ABC. W ten sposób transporter ABCA4 mógłby zapewnić ochronę cytozoluowego kompleksu enzymatycznego przed reaktywnym działaniem retinaldehydów (14).

Niezależnie od modelu transportu podejrzewa się, że defekt funkcjonowania białka ABCA4 prowadzi do akumulacji N-retynylieno-PE w fotoreceptorach. Ten związek może również reagować z kolejną cząsteczką all-trans-retinalu – to prowadzi do powstawania autofluorescencyjnej cząsteczki diretynoido-pirydino-fosfatydyloetanolaminy (A2PE). W procesie ciągłej odnowy fotoreceptorów dyski pręcików przemieszczają się od ich części podstawnej do najbardziej zewnętrznej, a następnie ulegają fagocytozie przez przylegające komórki RPE. W powstających kwasowych fagolizosomach A2PE jest hydrolizowane przez fosfolipazę D (ang. Phospholipase D – PLD) do cząsteczki A2E pozbawionej składowej fosfolipidowej. Do pewnego stopnia proces ten może również zachodzić w dyskach fotoreceptorów. Cząsteczka A2E nie może być dalej hydrolizowana i stanowi główny składnik lipofuscyny, która wraz z białkami, lipidami, fosfolipidami i składowymi retinoidów współtworzy ciało inkluzji.

zyjne (15). Dzięki właściwościom fluorescencyjnym lipofuscyna może być wykryta podczas badania autofluorescencji dna oka (ang. Fundus Autofluorescence – FAF).

Cząsteczki A2E mogą działać jako detergent zaburzający strukturę błony komórkowej i jej funkcję, uszkadzać fagolizosomy, a w konsekwencji wydostawać się do cytoplazmy, tam wiążąc się z białkami opiekuńczymi, uniemożliwiają ich prawidłowy udział w fałdowaniu białek (15, 16). Nagromadzenie lipofuscyny w lizosomach może również blokować prawidłowo zachodzącą autofagię zużytych mitochondriów – to sprzyja nieefektywnej produkcji ATP, stresowi oksydacyjnemu, który promuje dalsze gromadzenie się lipofuscyny w lizosomach, a także stresowi karbonyłowemu będącemu konsekwencją odkładania się karbonylowanych białek. Ponadto w obecności tlenu i światła widzialnego cząsteczki A2E biorą udział w formowaniu rodników epoksydów, dalej nasilając stres oksydacyjny i prowadząc do śmierci komórek RPE (17–19). W doświadczeniach przeprowadzonych na zwierzętach u myszy *abca4<sup>(-/-)</sup>* zauważono zwiększoną ekspresję genów stresu oksydacyjnego, peroksydację lipidów, a także wyższe stężenie produktów aktywacji dopełniacza. Ponadto odkryto, że ekspresja białek ostrej fazy, chroniących komórki przed atakiem układu dopełniacza, była niższa w komórkach RPE myszy *abca4<sup>(-/-)</sup>* niż w komórkach RPE myszy dzikich. Te wyniki mogą również sugerować, że choroba Stargardta, a także inne choroby siatkówki związane z akumulacją A2E mogą być spowodowane lub nasilane przez przewlekły stan zapalny komórek RPE (13).

Zwiększone stężenie cząsteczek A2E przyspiesza proces obumierania komórek RPE, a w konsekwencji również przylegających do nich fotoreceptorów. Komórki RPE oprócz podpory strukturalnej i odnowy zewnętrznych segmentów fotoreceptorów zapewniają im substancje odżywcze i biorą udział w regeneracji rodopsyny. Uszkodzenie RPE zatem prowadzi do postępującego niszczenia fotoreceptorów i stopniowej utraty wzroku (9).

#### 4. Postępowanie profilaktyczne i metody farmakologiczne

W niniejszej pracy szczególną uwagę poświęcono farmakologicznym próbom przeciwdziałania gromadzeniu się toksycznych produktów cyklu wzrokowego, stresowi oksydacyjnemu i karbonyłowemu, które w sposób bezpośredni lub pośredni mogłyby spowolnić bądź zahamować progresję dystrofii siatkówki ze szczególnym uwzględnieniem retinopatii *ABCA4*.

##### 4.1 Zalecenia mające na celu spowolnienie rozwoju choroby

Opracowywane strategie postępowania u chorych na chorobę Stargardta mają na celu zminimalizowanie skutków niewydolności transportera *ABCA4*, tj. ograniczenie syntezy i gromadzenia się toksycznych produktów świetlnych w fotoreceptorach i komórkach RPE. Radu i wsp. zauważyli, że ekspozycja na światło stymuluje formowanie cząsteczek A2E u myszy z chorobą Stargardta (20). Klevering i wsp. przeprowadzili badania u 5 chorych na chorobę Stargardta. U każdego pacjenta jedno oko ochraniano przed dostępem światła, drugie natomiast pozostawiano nieosłonięte. Opóźnienie progresji zmian w zasłoniętych oczach zaobserwowano u 4 spośród 5 badanych (21). W związku z tym pacjentom zaleca się noszenie ciemnych okularów i kapeluszy osłaniających ich przed wpływem długotrwałego działania światła. Biorąc pod uwagę mechanizm cho-

roby, jak również doniesienia o pogorszeniu widzenia, chorym na chorobę Stargardta i pacjentom z mutacjami genu *ABCA4* nie zaleca się suplementacji dużymi dawkami witaminy A. Tę tezę potwierdzają badania, które przeprowadzili Radu i wsp., zauważyli oni istotny wzrost stężenia A2E u myszy *abca4<sup>(-/-)</sup>* już po dwumiesięcznej suplementacji witaminą A (22). Wyniki badań wskazują, że takie postępowanie może być odpowiednie w przypadku wszystkich retinopatii *ABCA4*.

##### 4.2 Stosowanie szafranu w diecie

Szafran otrzymywany ze słupków krokusa (łac. *Crocus sativus*) od wieków jest używany jako przyprawa kuchenna, a w tradycyjnej medycynie chińskiej jako lek przeciwbólowy i uspokajający (23, 24). W zależności od uprawy i sposobu suszenia z krokusa są ekstrahowane substancje, których właściwości próbuje się wykorzystać w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych (25). Wyniki badań wskazują, że jednymi z najważniejszych substancji mogą być krocetyna i jej pochodna krocyna, które wykazują działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne i antyapoptotyczne (26, 27). Wyniki badań na zwierzętach pozwalają przypuszczać, że te związki mogą ochraniać fotoreceptory przed stresem oksydacyjnym starzejącej się siatkówki, ale także naprawiać wczesne uszkodzenia fotoreceptorów u chorych na chorobę Stargardta lub u pacjentów z dnem żółtobiałym (23, 28).

Na wczesnym etapie tych chorób jest zachowana liczba fotoreceptorów, pomimo pogarszającego się ich funkcjonowania. Szafran działa ochronnie na fotoreceptory, przez to zwiększa odpowiedź uszkodzonych, lecz nadal żywotnych komórek, skutkując polepszeniem czułości siatkówki. Bisti i wsp. badając obecność krocetyny w tkankach osób zdrowych i pacjentów z dystrofią plamki, odkryli, że ta substancja nie występuje w żadnej innej tkance z wyjątkiem uszkodzonej siatkówki. Ponadto u zdrowych ochotników zawsze wykrywano obecność krocetyny we krwi i moczu, podczas gdy u pacjentów często wynik tych badań był ujemny, to mogłoby sugerować, że metabolity substancji były szybko absorbowane i wykorzystywane (25). W 2011 roku we Włoszech rozpoczęto badanie kliniczne z udziałem chorych na chorobę Stargardta, którym suplementowano szafran, wyniki badania jednak nie zostały jeszcze opublikowane. Identyfikator badania klinicznego jest dostępny na stronie [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov), to NCT01278277.

##### 4.3 Substancje przeciwdziałające stresowi oksydacyjnemu i karbonyłowemu – floroglucyna

W patogenezie choroby Stargardta, ale także dystrofii plamki związanej z wiekiem – AMD, ważną rolę odgrywa stres oksydacyjny i karbonyłowcy, nasilający formowanie się cząsteczek A2E, prowadząc do uszkodzenia komórek siatkówki. Substancją, która mogłaby ograniczyć zarówno stres karbonyłowcy, jak i oksydacyjny, jest floroglucyna, czyli bezneno-1,3,5-triol. Badania Barbet i wsp. prowadzone na linii komórkowej RPE siatkówki szczura dowiodły, że inkubacja komórek z floroglucyną i all-trans-retinalem (atRAL) znacząco zwiększa przeżywalność komórek nabłonka barwnikowego siatkówki w porównaniu do komórek nietraktowanych floroglucyną. Inkubacja komórek w obecności floroglucyny, atRAL i etanoloaminy skutkuje całkowitym zahamowaniem syntezy cząsteczek A2E (29). Aby zwiększyć

żyć biodostępność floroglicyny, przeprowadzono badania, w których substancję tę łączono z izopropanolem, a także wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi WNK (ang. Polyunsaturated Fatty Acids – PUFA), do których zalicza się np. kwas dokozaheksaenowy (ang. Docosahexaenoic Acid – DHA) oraz linolowy (ang. Linoleic Acid – LA). Połączenie tych substancji znacząco zmniejszyło śmiertelność komórek nabłonka barwnikowej siatkówki (30).

#### 4.4 Podawanie C20-D3-witaminy A w diecie

Rozwiązaniem doraźnym w leczeniu choroby Stargarda mogłoby być zastosowanie w diecie witaminy A podstawionej stabilnym izotopem deuteru przy węglu 20 (ang. C20-D<sub>3</sub>-vitamin A). Wyniki badań pokazują, że witamina A z podstawionym izotopem deuteru dimeryzuje do cząsteczki A2E wolniej niż witamina A występująca naturalnie (31). W badaniach przeprowadzonych na świniami zmodyfikowaną witaminę A (C20-D3-witamina A) podawano w kapsułkach podczas karmienia wraz z normalnymi ilościami prowitaminy A pochodzącymi z diety, a następnie oceniano poziom kumulacji badanej substancji w RPE, osoczu, wątrobie, płucach i nerkach zwierząt. Uzyskano dane, które sugerują, że C20-D3 witamina A może szybko wymienić witaminę A w siatkówce gałki ocznej i potencjalnie spowalniać proces dimeryzacji witaminy A występującej w przyrodzie. W tym celu stosunek deuterowanej witaminy A do naturalnie występującej powinien być jak najwyższy, jednak całkowita ilość przyjętej witaminy powinna mieścić się w bezpiecznej normie zalecanej do spożycia (32).

Okres półtrwania witaminy A jest długi i wynosi w organizmie około 140 dni, a kontrola jej stężenia jest dość trudna, gdyż problematyczne jest ograniczenie witaminy A i karotenoidów w codziennej diecie (31). W Stanach Zjednoczonych średnia dzienna spożycia witaminy A w postaci retinolu wynosi 0,3 mg, witamina A głównie jest pobierana z pożywieniem. W przypadku konsumpcji 3,0 mg deuterowanej witaminy A dziennie, maksymalnej dziennej bezpiecznej dawki, 91% witaminy A będącej w organizmie może zostać zastąpione przez C20-D3-witaminę A (32). Podawanie deuterowanej witaminy w dowolnym momencie trwania choroby zmniejsza proces dimeryzacji witaminy i jej udział w formowaniu lipofuscyny i może spowolnić o dekady proces postępującego pogorszenia widzenia (33). W 2015 roku rozpoczęło się badanie kliniczne o numerze NCT02402660, które ma na celu określenie długoterminowego wpływu i bezpieczeństwa stosowania deuterowanej witaminy A (podawanej jako substancja o nazwie ALK-001; Alkeus Pharmaceuticals INC, Boston, Massachusetts, USA) u chorych na chorobę Stargarda. Planowany czas zakończenia badania to 2018 rok. Osoby, które chciałyby być informowane o przyszłych badaniach klinicznych Alkeus Pharma, a także są zainteresowane postępami w II fazie badań klinicznych mogą uzyskać informacje na stronie <http://www.alkeuspharma.com/trials.html>.

#### 4.5 Inhibitory konwertazy angiotensyny (ACE) – ramiprylat

Pojawiły się również doniesienia nt. prób leczenia chorych na dziedziczne choroby siatkówki ramiprylatem – inhibitorem konwertazy angiotensyny. Mechanizm ochronnego działania tej substancji na komórki fotoreceptorowe nie został jeszcze

dokładnie opisany w literaturze medycznej. Lek hamuje enzym konwertazę angiotensyny (ang. Angiotensin-Converting Enzyme – ACE), która przekształca angiotensynę I w angiotensynę II. Receptory dla angiotensyny II (AT1R i AT2R) znajdują się w błonach komórkowych wielu komórek, w tym również fotoreceptorów. Angiotensyna II poprzez odpowiednie receptory (zwłaszcza AT1R) zwiększa ekspresję naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (ang. Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF), nasilając przepuszczalność naczyń naczyniówki i angiogenezę. Ponadto angiotensyna II poprzez receptor AT1R może prowadzić do zapalenia siatkówki, aktywując szlak sygnałny jądrowego czynnika-κB (ang. Nuclear Factor-κB – NF-κB), to skutkuje uwolnieniem prozapalnych cytokin pogłębiających zapalenie. Dodatkowo angiotensyna II poprzez aktywację oksydazy NADPH może prowadzić do zwiększenia ilości wolnych form tlenowych w siatkówce, a w konsekwencji do stresu oksydacyjnego (34). Enzym konwertazy angiotensyny oprócz przemiany angiotensyny I do II powoduje również rozpad bradykininy, dla której receptory B2 znajdują się również w neuronach siatkówki (35). Bradykinina działając poprzez receptory B2, zmniejsza uwalnianie reaktywnych form tlenowych, dzięki temu zmniejsza stres oksydacyjny komórek, a także indukuje uwalnianie tlenu azotu, który działa ochronnie na neurony.

Podsumowując, stosowanie inhibitorów ACE pozwala na obniżenie mian VEGF w ciele szklistym gałki ocznej i zmniejszenie rozpadu bradykininy, a w konsekwencji zmniejszenie uwalniania reaktywnych form tlenowych wobec jednoczesnego zwiększenia uwalniania tlenu azotu, który działa ochronnie na komórki nerwowe, w tym również na fotoreceptory siatkówki (36).

#### 4.6 Inhibitor wzrostu fibroblastów – dobesyln

Choroby Stargarda oraz AMD są związane z przewlekłym procesem zapalnym toczącym się w komórkach nabłonka barwnikowej siatkówki (13, 37). W modelu mysim choroby Stargarda, jeszcze przed wystąpieniem zmian fenotypowych w siatkówce, obserwuje się zwiększenie ekspresji kwaśnego białka włóknikowego (ang. Glial Fibrillary Acidic Protein – GFAP), które jest powszechnym markerem stresu i degeneracji siatkówki. Jednocześnie bardzo silnie wzrasta ekspresja czynnika wzrostu fibroblastów (ang. Fibroblast Growth Factor – FGF), którego wysokie miano utrzymują się aż do utraty komórek czopkonośnych (37, 38). Czynnikiem wzrostu fibroblastów jest mitogenem o szerokim spektrum działania, szczególnie silnie jednak jest związany z rozwojem procesu zapalnego. Miejscowe zastosowanie inhibitorów FGF mogłoby pomóc w kontrolowaniu procesu zapalnego towarzyszącego chorobie Stargarda. Przykładem syntetycznego inhibitora FGF jest dobesyln, który od ponad 35 lat jest używany w leczeniu retinopatii cukrzycowej. Cuevas i wsp. sugerują, że już mierna poprawa architektury komórek RPE poprzez zmniejszenie procesu zapalnego wystarczy, aby znacząco polepszyć jakość widzenia. Podanie choremu na chorobę Stargarda roztworu dobesylnu drogą iniekcji do ciała szklistego skutkowało poprawą ostrości wzroku w okresie czterech tygodni od podania (37). Przeciwwskazaniami do doustnego stosowania dobesylnu wapnia są podwyższone stężenie wapnia we krwi i niewydolność serca leczona glikozydami nasercowymi, ponadto należy zachować ostrożność w przypadku kamicy nerkowej.

#### 4.7 Aminy pierwszorzędowe

Maeda i wsp. prowadzili badania na myszach z wykorzystaniem substancji zawierających aminy pierwszorzędowe i ich pochodne, dopuszczone przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration – FDA) do stosowania u ludzi i zwierząt (39). Aminy pierwszorzędowe krótkotrwale i odwracalnie wiążą się z aldehydami, np. atRAL, tworząc zasadę Shiffa i w ten sposób ograniczając ich nadmiar. Ponadto współzawodniczą z cząsteczkami PE i zapobiegają dalszemu formowaniu A2E. Po pewnym czasie zasada Shiffa rozpada się i stopniowo uwalnia związane aldehydy, jednak w małym stężeniu, to pozwala komórkom fotoreceptorowym przekształcić je do nietoksycznego alkoholu, bez zaburzenia cyklu wzrokowego. Najlepsze rezultaty otrzymano dla substancji nazwanych: A20, A22 i A24 (tab. I), które bardzo dobrze przeciwdziałały postępującej degeneracji siatkówki indukowanej światłem i charakteryzowały się dobrą biodostępnością. Przed zastosowaniem leków w terapii retinopatii *ABCA4* konieczne jest przeprowadzenie badań klinicznych, które potwierdzą ich terapeutyczny charakter.

Nazwa/ Name	Nazwa chemiczna/ Chemical name	Zastosowanie/ Application
<b>A20</b>	kwasy R-3-(aminometylo)-5-metyloheksanowy/ R-3-(aminomethyl)-5-methylhecanoic acid	nieokreślone/ undefined
<b>A22</b> Mesalazyna/ Mesalazine	kwasy 5-amino-2-hydroksybenzoesowy/ 5-amino-2-hydroxybenzoic acid	wrzodziejące zapalenie jelita grubego, lek przeciwzapalny/ ulcerative colitis (inflammatory bowel disease), inflammatory agent
<b>A24</b> Retinylamina/ Retinylamine	(2E,4E,6E,8E)-3,7-dimetylo-9-(2,6,6-trimetylocykloheks-1-enyl)- nona-2,4,6,8-tetraen-1-amina/ (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)- nona-2,4,6,8-tetraen-1-amine	substancja eksperymentalna: inhibitor izomerazy retinoidów/ experimental drug: inhibitor of retinoid isomerase

Tab. I. Aminy pierwszorzędowe testowane w celu przeciwdziałania postępującej degeneracji siatkówki.

Tab. I. Primary amines tested for counteracting the process of progressive retinal degeneration.

#### 4.8 Korektory *ABCA4*

Metodą, która mogłaby znaleźć zastosowanie w procesie naprawy defektów konkretnych genów, jest użycie tzw. korektorów DNA. Wyniki uzyskane podczas fazy IIa badań klinicznych dotyczących terapii mukowiscydozy korektorami genu *CFTR* skłoniły badaczy do poszukiwania możliwości terapeutycznych tej metody także u pacjentów z dysfunkcją genu podobnego przestrzennie do *CFTR*, czyli *ABCA4* (40). Geny *ABCA4* i *CFTR* należą do tej samej nadrodziny transporterów ABC i wykazują dużą homologię sekwencji. W badaniach dotyczących leczenia mukowiscydozy wykorzystuje się małe cząsteczki ukierunkowane na konkretny defekt genu *CFTR*. Te modulatory w zależności od ich mechanizmu reakcji podyktowanego rodzajem mutacji, na który działają, są grupowane w potencjatory (ang. potentiators) polepszające funkcję białka, korektory (ang. correctors) zwiększające składanie i dostarczanie funkcjonalnych białek i czynniki omijające lub inaczej korektory produkcji (ang. read-through agents lub production correctors), które pozwalają na pominięcie przedwcześnie zmutowanego kodonu stop i kontynuację translacji (41–43). Badacze uwagę skupiają zwłaszcza na cząsteczce VX-809 (Lumacaftor; Vertex Pharmaceuticals, Boston, MA, USA), która przeszła pomyślnie już II fazę badań klinicznych w leczeniu mukowiscydozy. Niestety, dotychczas

nie zaprojektowano korektorów przeznaczonych dla retinopatii *ABCA4*, jednakże Sabirzhanova i wsp. pokazali, że być może w przyszłości cząsteczka VX-809 znajdzie zastosowanie również w leczeniu choroby Stargardta. Konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań potwierdzających skuteczność ewentualnej terapii tym związkiem (40).

#### 4.9 Kwas dokozaheksaenowy, DHA

Substancją, która występuje w bardzo dużym stężeniu w komórkach fotoreceptorowych, jest kwas dokozaheksaenowy (ang. Docosahexaenoic Acid – DHA). Ma on właściwości antyoksydacyjne, antyproliferacyjne oraz antyapoptotyczne. Ponadto zwiększa aktywność mitochondriów oraz lipazy znajdującej się m.in. w komórkach RPE (44). Z uwagi na działanie przeciwzapalne DHA podejrzewano, że ten związek może pełnić znaczącą rolę w ochronie komórek w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych, w tym w dystrofii siatkówki. Wyniki badań wykazały, że suplementacja kwasem DHA jest zasadna w przypadku tych dystrofii, w przebiegu których jego synteza jest zaburzona.

Przykładem takiej retinopatii jest dystrofia plamki wywołana mutacjami w genie *ELOVL4* i przypominająca klinicznie chorobę Stargardta (STD3). Gen *ELOVL4* koduje enzym zaangażowany w syntezę bardzo długich łańcuchów kwasów tłuszczowych, takich jak DHA, mutacje *ELOVL4* zatem wpływają na zmniejszenie stężenia DHA w komórkach fotoreceptorowych. Zgodnie z tym stopień nasilenia STD3 jest odwrotnie proporcjonalny do stężenia DHA we krwi (45).

Dornstauder i wsp. pokazali, że DHA opóźnia proces neurodegeneracji zarówno w siatkówkach osób zdrowych, jak i w siatkówkach chorych na STD3, niemniej jednak u pacjentów, u których stopień neurodegeneracji jest zaawansowany, suplementacja DHA może nie być wystarczająca (46). U pacjentów z retinopatią *ABCA4* o wczesnym początku choroby nie przeprowadzono badań dotyczących wpływu kwasu DHA na przebieg choroby. Querques i wsp. przeprowadzili jednak badania z udziałem 20 chorych na chorobę Stargardta niezwiązaną z mutacjami w genie *ELOVL4*, której objawy wystąpiły w późnym wieku (tj.  $45 \pm 15$  lat) tzw. „late-onset”. Przez pół roku podawano im 840 mg DHA na dobę. Niewielką poprawę jakości widzenia i zmian w obrazie badania wieloogniskowej elektroretinografii (mfERG) zanotowano jedynie u 4 pacjentów, u pozostałych badanych nie zaobserwowano ani poprawy, ani progresji

choroby (47). W świetle tych doniesień widać, jak ogromną rolę odrywa diagnostyka genetyczna, dzięki niej są możliwe identyfikacja podłoża molekularnego choroby i wdrożenie odpowiedniego postępowania terapeutycznego.

## 5. Zakończenie

W niniejszej pracy przedstawiono próby postępowania farmakologicznego, które mogłyby przeciwdziałać chorobom siatkówki wywołanym mutacjami w genie *ABCA4*, w przebiegu których dochodzi do akumulacji toksycznych produktów cyklu wzrokowego, powstawania stresu oksydacyjnego i karbonylowego oraz stopniowej utraty fotoreceptorów i otaczających je komórek RPE. Do dzisiaj nie opracowano skutecznej metody leczenia tych chorób. Niemniej jednak intensywny rozwój prowadzonych obecnie badań i różnorodność ich kierunków dają nadzieję, że wkrótce zostanie opracowana skuteczna forma terapii.

**Publikacja powstała w związku z realizacją projektu Narodowego Centrum Nauki N N402 591640 (5916/B/P01/2011/40) oraz projektu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego 1M15/PM11D/14.**

## Piśmiennictwo:

- Bird AC: *Retinal photoreceptor dystrophies LI. Edward Jackson Memorial Lecture*. Am J Ophthalmol. 1995; 119: 543–562.
- Stępień MW, Goś R: *Obecny stan wiedzy i perspektywy w leczeniu dziedzicznych schorzeń siatkówki*. Okulistyka. 2003; 6: 1–6.
- Higgins CF: *ABC transporters: from microorganisms to man*. Annu Rev Cell Biol. 1992; 8: 67–113.
- Burton DS, Ali M, McKibbin M: *Retinal phenotypes in patients homozygous for the G1961E mutation in the ABCA4 gene*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013; 54: 520.
- Jaakson K, Zernant J, Kulm M, Hutchinson A, Tonisson N, Glavac D, et al.: *Genotyping microarray (gene chip) for the ABCR (ABCA4) gene*. Hum Mutat. 2003; 22: 395–403.
- Scieczynska A, Oziebło D, Ambroziak AM, Korwin M, Szulborski K, Krawczyński M, et al.: *Next-generation sequencing of ABCA4: High frequency of complex alleles and novel mutations in patients with retinal dystrophies from Central Europe*. Exp Eye Res. 2015; 145: 93–99.
- Wisniewski W, Zaremba CM, Yatsenko AN, Jamrich M, Wensel TG, Lewis RA, et al.: *ABCA4 mutations causing mislocalization are found frequently in patients with severe retinal dystrophies*. Hum Mol Genet. 2005; 14: 2769–2778.
- van Driel MA, Maugeri A, Klevering BJ, Hoyng CB, Cremers FP: *ABCR unites what ophthalmologists divide(s)*. Ophthalmic Genet. 1998; 19: 117–122.
- Molday RS: *ATP-binding cassette transporter ABCA4: molecular properties and role in vision and macular degeneration*. J Bioenerg Biomembr. 2007; 39: 507–517.
- Mustafi D, Engel AH, Palczewski K: *Structure of cone photoreceptors*. Prog Retin Eye Res. 2009; 28: 289–302.
- Kiser PD, Golczak M, Maeda A, Palczewski K: *Key enzymes of the retinoid (visual) cycle in vertebrate retina*. Biochim Biophys Acta. 2012; 1821: 137–151.
- Quazi F, Lenevich S, Molday RS: *ABCA4 is an N-retinylidene-phosphatidylethanolamine and phosphatidylethanolamine importer*. Nat Commun. 2012; 3: 925.
- Radu RA, Hu J, Yuan Q, Welch DL, Makshanoff J, Lloyd M, et al.: *Complement system dysregulation and inflammation in the retinal pigment epithelium of a mouse model for Stargardt macular degeneration*. J Biol Chem. 2011; 286: 18593–18601.
- Boyer NP, Higbee D, Currin MB, Blakeley LR, Chen C, Ablonczy Z, et al.: *Lipofuscin and N-retinylidene-N-retinylethanolamine (A2E) accumulate in retinal pigment epithelium in absence of light exposure: their origin is 11-cis-retinal*. J Biol Chem. 2012; 287: 22276–22286.
- Mata NL, Weng J, Travis GH: *Biosynthesis of a major lipofuscin fluorophore in mice and humans with ABCR-mediated retinal and macular degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97: 7154–7159.
- Eldred GE, Lasky MR: *Retinal age pigments generated by self-assembling lysosomotropic detergents*. Nature. 1993; 361: 724–726.
- Sparrow JR, Nakanishi K, Parish CA: *The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light-induced damage to retinal pigmented epithelial cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000; 41: 1981–1989.
- Sparrow JR, Boulton M: *RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology*. Exp Eye Res. 2005; 80: 595–606.
- Sauer T, Patel M, Chan CC, Tuo J: *Unfolding the Therapeutic Potential of Chemical Chaperones for Age-related Macular Degeneration*. Expert Rev Ophthalmol. 2008; 3: 29–42.
- Radu RA, Mata NL, Nusinowitz S, Liu X, Sieving PA, Travis GH: *Treatment with isotretinoin inhibits lipofuscin accumulation in a mouse model of recessive Stargardt's macular degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100: 4742–4747.
- Teussink MM, Lee MD, Smith RT, van Huet RA, Klaver CC, Klevering BJ, et al.: *The effect of light deprivation in patients with Stargardt disease*. Am J Ophthalmol. 2015; 159: 964–972 e962.
- Radu RA, Yuan Q, Hu J, Peng JH, Lloyd M, Nusinowitz S, et al.: *Accelerated accumulation of lipofuscin pigments in the RPE of a mouse model for ABCA4-mediated retinal dystrophies following Vitamin A supplementation*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008; 49: 3821–3829.
- Maccarone R, Di Marco S, Bisti S: *Saffron supplement maintains morphology and function after exposure to damaging light in mammalian retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008; 49: 1254–1261.
- Ochiai T, Shimeno H, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Tanaka H, et al.: *Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo*. Biochim Biophys Acta. 2007; 1770: 578–584.
- Bisti S, Maccarone R, Falsini B: *Saffron and retina: neuroprotection and pharmacokinetics*. Vis Neurosci. 2014; 31: 355–361.
- Giaccio M: *Crocetin from saffron: an active component of an ancient spice*. Crit Rev Food Sci Nutr. 2004; 44: 155–172.
- Laabich A, Vissvesvaran GP, Lieu KL, Murata K, McGinn TE, Manmoto CC, et al.: *Protective effect of crocin against blue light- and white light-mediated photoreceptor cell death in bovine and primate retinal primary cell culture*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006; 47: 3156–3163.
- Falsini B, Piccardi M, Minnella A, Savastano C, Capoluongo E, Fadda A, et al.: *Influence of saffron supplementation on retinal*

- flicker sensitivity in early age-related macular degeneration*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010; 51: 6118–6124.
29. Brabet P, Cia D, Vigor C, Jacquemot N, Lerat B, Guillou L, et al.: *Assessment of the therapeutic value of phloroglucinol in Stargardt's disease*. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2013; 54: 1949–1949.
  30. Brabet P, Aurélie C, Cia D, Crauste C, Guillou L, Jacquemot N, et al.: *Polyunsaturated Fatty Acid–Phloroglucinol conjugates protect RPE and Neural Retina against All–trans–Retinal–induced Damages*. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2015; 56: 29–29.
  31. Kaufman Y, Ma L, Washington I: *Deuterium enrichment of vitamin A at the C20 position slows the formation of detrimental vitamin A dimers in wild–type rodents*. J Biol Chem. 2011; 286: 7958–7965.
  32. Mihai DM, Jiang H, Blaner WS, Romanov A, Washington I: *The retina rapidly incorporates ingested C20–D(3)–vitamin A in a swine model*. Mol Vis. 2013; 19: 1677–1683.
  33. Charbel Issa P, Barnard AR, Herrmann P, Washington I, MacLaren RE: *Rescue of the Stargardt phenotype in Abca4 knockout mice through inhibition of vitamin A dimerization*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015; 112: 8415–8420.
  34. Li T, Lewallen M, Chen S, Yu W, Zhang N, Xie T: *Multipotent stem cells isolated from the adult mouse retina are capable of producing functional photoreceptor cells*. Cell Res. 2013; 23: 788–802.
  35. Ma JX, Song Q, Hatcher HC, Crouch RK, Chao L, Chao J: *Expression and cellular localization of the kallikrein–kinin system in human ocular tissues*. Exp Eye Res. 1996; 63: 19–26.
  36. Rekić R, Charfeddine R: *Primary observations of the effects of ACE inhibitor ramipril in patients with Stargardt's disease*. Acta Ophthalmologica. 2012; doi: 10.1111/j.1755-3768.2012.S091.x.
  37. Cuevas P, Outeirino LA, Angulo J, Gimenez–Gallego G: *Treatment of Stargardt disease with dobesilate*. BMJ Case Rep. 2012; doi:10.1136/bcr-2012-007128.
  38. Kuny S, Gaillard F, Sauve Y: *Differential gene expression in eyecup and retina of a mouse model of Stargardt–like macular dystrophy (STGD3)*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012; 53: 664–675.
  39. Maeda A, Golczak M, Chen Y, Okano K, Kohno H, Shiose S, et al.: *Primary amines protect against retinal degeneration in mouse models of retinopathies*. Nat Chem Biol. 2012; 8: 170–178.
  40. Sabirzhanova I, Lopes Pacheco M, Rapino D, Grover R, Handa JT, Guggino WB, et al.: *Rescuing Trafficking Mutants of the ATP–binding Cassette Protein, ABCA4, with Small Molecule Correctors as a Treatment for Stargardt Eye Disease*. J Biol Chem. 2015; 290: 19743–19755.
  41. Sloane PA, Rowe SM: *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein repair as a therapeutic strategy in cystic fibrosis*. Curr Opin Pulm Med. 2010; 16: 591–597.
  42. O'Sullivan BP, Freedman SD: *Cystic fibrosis*. Lancet. 2009; 373: 1891–1904.
  43. Rogan MP, Stoltz DA, Hornick DB: *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator intracellular processing, trafficking, and opportunities for mutation–specific treatment*. Chest. 2011; 139: 1480–1490.
  44. Rotstein NP, Politi LE, German OL, Girotti R: *Protective effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress–induced apoptosis of retina photoreceptors*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003; 44: 2252–2259.
  45. Hubbard AF, Askew EW, Singh N, Leppert M, Bernstein PS: *Association of adipose and red blood cell lipids with severity of dominant Stargardt macular dystrophy (STGD3) secondary to an ELOVL4 mutation*. Arch Ophthalmol. 2006; 124: 257–263.
  46. Dornstauder B, Suh M, Kuny S, Gaillard F, Macdonald IM, Clanin MT, et al.: *Dietary docosahexaenoic acid supplementation prevents age–related functional losses and A2E accumulation in the retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012; 53: 2256–2265.
  47. Querques G, Benlian P, Chanu B, Leveziel N, Coscas G, Soubraane G, et al.: *DHA supplementation for late onset Stargardt disease: NAT–3 study*. Clin Ophthalmol. 2010; 4: 575–580.

Praca wpłynęła do Redakcji 19.08.2015 r. (KO-00026-2015)  
Zakwalifikowano do druku 29.12.2015 r.

**Adres do korespondencji (Reprint requests to):**  
**dr hab. n. med. Monika Ołdak**  
**Zakład Genetyki Światowe Centrum Słuchu,**  
**Instytut Fizjologii i Patologii Słuchu**  
**ul. Mokra 17**  
**Kajetany 05-830 Nadarzyn**  
**e-mail: m.oldak@ifps.org.pl**