



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΗ ΟΠΤΙΚΗ
ΝΕΥΡΟΠΑΘΕΙΑ LEBER (LHON)»**

**ΑΘΑΝΑΣΙΑ ΕΥΑΓΓΕΛΙΝΟΥ
ΙΑΤΡΟΣ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΑΝ/ΜΙΟΥ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, Επιβλέπουσα**

**ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝ/ΜΙΟΥ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, Μέλος**

**ΙΩΑΝΝΑ ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΝ/ΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, Μέλος**

ΛΑΡΙΣΑ, 2023



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE



POSTGRADUATE MASTER PROGRAM
“HUMAN GENETICS – GENETIC COUNSELING”

MASTER’S THESIS
«GENE THERAPY FOR LEBER HEREDITARY OPTIC NEUROPATHY»

ATHANASIA EVANGELINOU

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κυρία Ασπασία Τσέζου, για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, την υπομονή της και την επιστημονική της καθοδήγηση για την διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κύριο Δήμα Κωνσταντίνο και κυρία Ιωάννα Παπαθανασίου, για την συμβολή τους στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη συμπαράσταση και τη στήριξή τους κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της μελέτης ήταν η βιβλιογραφική ανασκόπηση της γονιδιακής θεραπείας στην κληρονομική οπτική νευροπάθεια Leber.

Για τη συλλογή δεδομένων χρησιμοποιήθηκε ο ιστότοπος pubmed , η ιστοσελίδα clinicaltrials.gov και η μηχανή αναζήτησης google. Οι λέξεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: Leber hereditary optic neuropathy + gene therapy, LHON , ND4, rAAV2-ND4 και LHON therapy.

Στο πρώτο κεφάλαιο περιγράφεται η ασθένεια της LHON, στο δεύτερο γίνεται μία αναφορά σε άλλες θεραπευτικές προσεγγίσεις και στο τρίτο κεφάλαιο αναλύονται κλινικές δοκιμές φάσης I, I/II, I/IIa και III καθώς και μελέτες παρακολούθησης ασθενών. Τα πλέον σημαντικά αποτελέσματα εμφανίζονται στις 3 κλινικές δοκιμές φάσης III. Οι δύο από αυτές είναι η RESCUE και η REVERSE, στις οποίες πραγματοποιήθηκε 1 μονόπλευρη ενδοϋαλοειδική έγχυση του rAAV2-ND4, σε ασθενείς με LHON και απώλεια όρασης έως 6 μήνες στην πρώτη και από 6 έως 12 μήνες στη δεύτερη. Η REFLECT είναι η 3^η φάσης III κλινική δοκιμή στην οποία πραγματοποιήθηκε αμφοτερόπλευρη έγχυση της γονιδιακής θεραπείας.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η γονιδιακή θεραπεία είναι ασφαλής και καλά ανεκτή. Οι πιο συνηθισμένες ανεπιθύμητες ενέργειες είναι η ενδοφθάλμια φλεγμονή (πρόσθια ή ενδιάμεση ραγοειδίτιδα) και η παροδική αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης. Μία καλά ανεκτή δοσολογία, η οποία χορηγήθηκε και στις κλινικές δοκιμές φάσης III ήταν η 9×10^{10} vg. Η αποτελεσματικότητά της θεραπείας στην βελτίωση της οπτικής οξύτητας ήταν εμφανής. Οι ερευνητές παρατήρησαν, επίσης, αμφοτερόπλευρη βελτίωση της όρασης στους ασθενείς που έλαβαν μονόπλευρη ενδοϋαλοειδική έγχυση, το οποίο αποτέλεσε ένα αναπάντεχο εύρημα. Τέλος, η αμφοτερόπλευρη ενδοϋαλοειδική έγχυση έδειξε καλύτερη αποτελεσματικότητα από την μονόπλευρη.

Λέξεις- Κλειδιά: κληρονομική οπτική νευροπάθεια Leber, rAAV2-ND4, κλινικές δοκιμές, γονιδιακή θεραπεία

ABSTRACT

The purpose of this study was the literature review for the gene therapy for Leber hereditary optic neuropathy.

Pubmed , clinicaltrials.gov and google were used in order to collect data. Key words used were the following: Leber hereditary optic neuropathy + gene therapy, LHON, ND4, rAAV2-ND4 and LHON therapy.

In the first chapter Leber hereditary optic neuropathy is described, in the second other treatment options and in the third are provided phase I, I/II, I/IIa and III clinical trials as well as follow-up studies. The most significant results come from the 3 phase III clinical trials. RESCUE and REVERSE are two of the phase 3 clinical trials, in which 1 monocular injection was performed, in patients with loss of vision up to 6 months in the first study and 6 to 12 months in the second. REFLECT is the third clinical trial, in which patients received a bilateral intravitreal injection.

According to the results gene therapy is safe and well tolerated. The most frequent adverse events are intraocular inflammation (anterior and intermediate uveitis) and a temporary increase in intraocular pressure. A well tolerated dose, which was also injected in all phase III clinical trials is 9×10^{10} vg. The efficacy of the therapy in the improvement of visual acuity was obvious. The investigators observed a bilateral improvement of vision in patients who received a monocular intravitreal injection, which was an unexpected finding. Lastly, binocular injection had an improved efficacy than the monocular one.

Key words: Leber hereditary optic neuropathy, rAAV2-ND4, clinical trials, gene therapy

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΗ ΟΠΤΙΚΗ ΝΕΥΡΟΠΑΘΕΙΑ LEBER....	7-21
1.1.Εισαγωγή.....	7
1.2.Εμβρυολογία.....	7-8
1.3.Ανατομία.....	8-10
1.3.1Αμφιβληστροειδής.....	8-9
1.3.2Οπτικό νεύρο.....	9-10
1.4.Μιτοχόνδια.....	10-12
1.5.Επιδημιολογία.....	12
1.6.Παθοφυσιολογία.....	12-13
1.7.Μεταλλάξεις στη LHON.....	13-14
1.8.Κλινικά συμπτώματα και σημεία.....	14-16
1.9.Διάγνωση.....	16
1.10.Διαφορική διάγνωση.....	16-17
1.11.Μεταβολές στις παραμέτρους διαγνωστικών μεθόδων.....	18-19
1.12. Γενετική συμβουλευτική.....	19-20
1.13.Φυλετική προτίμηση.....	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΑΛΛΕΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ.....	21-26
2.1.Αντιοξειδωτική θεραπεία.....	21
2.1.1. Ιδεβενόνη.....	21-22
2.2.ΕΡΙ-743.....	22
2.3.Κυκλοσπορίνη.....	22
2.4.Βριμονιδίνη.....	23
2.5.Οιστρογόνα.....	23
2.6.Προοπτικές για μελλοντική θεραπεία.....	23-26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	26-58
3.1.Γονιδιακή θεραπεία με AAV2-ND4.....	26-27
3.2.Κλινική δοκιμή φάσης I (NCT01267422).....	27-34
3.3.Κλινική δοκιμή φάσης I/II.....	34-36
3.4.Κλινική δοκιμή φάσης I (NCT02161380).....	37-40
3.5.Κλινική δοκιμή φάσης I/IIa (REVEAL).....	40-43
3.6.Κλινική δοκιμή φάσης III (RESCUE).....	43-46
3.7.Κλινική δοκιμή φάσης III (REVERSE).....	46-50

3.8.Μελέτη παρακολούθησης (RESTORE).....	50-51
3.9.Κλινική δοκιμή φάσης ΙΙΙ (REFLECT).....	51-54
3.10. Κλινική δοκιμή φάσης ΙΙ/ΙΙΙ (NCT03153293).....	54-58
3.11. Μη τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή.....	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	59-60
ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ.....	61
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	62-68

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΗ ΟΠΤΙΚΗ ΝΕΥΡΟΠΑΘΕΙΑ LEBER

1.1. Εισαγωγή

Η κληρονομική οπτική νευροπάθεια Leber (LHON) είναι μία σπάνια εκφύλιση των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, η οποία χαρακτηρίζεται από αμφοτερόπλευρη ανώδυνη απώλεια της όρασης. (Newman et al., 2022; Spiegel & Sadun, 2022) Η LHON κληρονομείται μιτοχονδριακά από τη μητέρα. Έχουν βρεθεί περίπου 45 διαφορετικές παθογόνες μεταλλάξεις. (Mejia-Vergara et al., 2020). Οι τρεις συχνότερες είναι οι εξής: στο γονίδιο ND1 η G3460A, στο γονίδιο ND4 η G11778A και στο γονίδιο ND6 η T14484C. (Newman et al., 2021). Η πιο τυπική ηλικία εμφάνισης είναι 15 με 35 ετών και προσβάλλει περισσότερο τους άντρες από τις γυναίκες, ωστόσο η έναρξη απώλειας της όρασης επεκτείνεται σε πάνω από 8 δεκαετίες ζωής. (Newman et al., 2020) Συνήθως η απώλεια της όρασης είναι κεντρική και ανώδυνη, σε ποσοστό 25%-50% είναι ταυτόχρονα αμφοτερόπλευρη ενώ στο 50%-75% πλήττεται πρώτα ο ένας οφθαλμός και σε ένα διάστημα ημερών, εβδομάδων ή μηνών και ο δεύτερος. Μέσα σε 1 χρόνο οι ασθενείς έχουν αμφοτερόπλευρη απώλεια όρασης σε ποσοστό 97%. (Newman et al., 2020) Έτσι, σε όλους τους ασθενείς με αμφοτερόπλευρη οπτική νευροπάθεια πρέπει να τίθεται η υποψία της νόσου. (Bowling, 2016).

1.2. Εμβρυολογία

Το κεντρικό νευρικό σύστημα περιλαμβάνει την οπτική οδό, η οποία αποτελείται από τον αμφιβληστροειδή, το οπτικό νεύρο, το οπτικό χίασμα, τις οπτικές ταινίες, τα έξω γονατώδη σώματα, τις οπτικές ακτινοβολίες και τις περιοχές του οπτικού φλοιού.

Ο αμφιβληστροειδής εξελίσσεται από το οπτικό κύπελλο. Δύο εξελικτικές στιβάδες τον χαρακτηρίζουν: η χρωστική και η νευροαισθητήρια. Η χρωστική σχηματίζεται από τη λεπτότερη, εξωτερική στιβάδα του οπτικού κυπέλλου ενώ η νευροαισθητήρια σχηματίζεται από την εσωτερική. Η τελευταία αποτελείται από την έσω και έξω νευροβλαστική στιβάδα. Η έσω νευροβλαστική δημιουργεί τα γαγγλιακά και τα αμακρόινα κύτταρα, καθώς και τα σώματα των υποστηρικτικών ινών του Müller. Η έξω νευροβλαστική δημιουργεί τα οριζόντια, τα δίπολα νευρικά, καθώς, και τα κωνιοφόρα και ραβδιοφόρα κύτταρα. Όλες οι στιβάδες του αμφιβληστροειδούς είναι

πλέον αναγνωρίσιμες μέχρι τον 8ο μήνα της εμβρυϊκής ζωής, ωστόσο τα κύτταρα των φωτοϋποδοχέων συνεχίζουν να σχηματίζονται και μετά τη γέννηση.

Αμέσως μετά τη μεσοπερίοδο (5ος μήνας), η ωχρά κηλίδα αναπτύσσεται ως προβολή πυρίνων στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων. Κατά τον 7ο μήνα τα γαγγλιακά κύτταρα παρεκτοπίζονται περιφερικά και δημιουργείται ένα εντύπωμα, το κεντρικό βοθρίο, ενώ κατά τη γέννηση σε αυτή την περιοχή αποτελούν μόνο μία μονή στιβάδα και μέχρι τον 4ο μήνα ζωής εξαφανίζονται δημιουργώντας το βοθρίδιο.

Στη θέση όπου θα διαμορφωθεί ο οπτικός δίσκος συγκλίνουν οι άξονες που αναπτύσσονται από τα γαγγλιακά κύτταρα. Η κοιλότητα του οπτικού μίσχου εξαφανίζεται ενώ τα κύτταρά του διαφοροποιούνται σε νευρογλοιακά, τα οποία λειτουργούν υποστηρικτικά προς τους άξονες. Το οπτικό νεύρο σχηματίζεται από τον οπτικό μίσχο μαζί με τους οπτικούς άξονες, οι οποίοι συνεχίζοντας την πορεία τους διασταυρώνονται μερικώς στο οπτικό χίασμα. Προς τα πίσω φέρονται ως οπτικές ταινίες, οι οποίες στην πλειονότητά τους καταλήγουν στο έξω γονατώδες σώμα και στο τετράδυμο πέταλο του μεσεγκεφάλου. (Snell R. & Lemp M.)

1.3. Ανατομία

1.3.1. Αμφιβληστροειδής

Ο αμφιβληστροειδής είναι ο χιτώνας του οφθαλμού πάνω στον οποίο δημιουργούνται τα οπτικά είδωλα, το οπτικό νεύρο λαμβάνει τα νευρικά ερεθίσματα που έχουν δημιουργηθεί επάνω στον αμφιβληστροειδή τα οποία μεταφέρει στον εγκέφαλο μέσω της οπτικής οδού. Το εξωτερικό τμήμα του αμφιβληστροειδή ονομάζεται μελάγχρουν επιθήλιο και το εσωτερικό νευροαισθητήριο τμήμα, ιδίως αμφιβληστροειδής. Η ωχρά κηλίδα βρίσκεται στο κέντρο του και αυτή είναι υπεύθυνη για την πλέον ευκρινή όραση. Το κεντρικό βοθρίο αποτελεί μία κεντρική εμβύθιση στην περιοχή της ωχράς.

Το μελάγχρουν επιθήλιο έχει μία στιβάδα κυττάρων, οι λειτουργίες των οποίων είναι: “η απορρόφηση του φωτός, η συμμετοχή στην ανακύκλωση των εξωτερικών τμημάτων των φωτοϋποδοχέων, ο σχηματισμός ροδοψίνης και ιωδοψίνης αποθηκεύοντας και εκλύοντας βιταμίνη Α, η οποία αποτελεί πρόδρομη ουσία για τις φωτοευαίσθητες χρωστικές.”

Ο ιδίως αμφιβληστροειδής αποτελείται από φωτοϋποδοχείς, δίπολα κύτταρα, γαγγλιακά κύτταρα, οριζόντια, αμακρόνια και υποστηρικτά κύτταρα.

Το ρόλο των αισθητικών υποδοχέων αναλαμβάνουν οι φωτοϋποδοχείς. Το ρόλο των νευρώνων πρώτης τάξεως τα δίπολα κύτταρα, των νευρώνων δεύτερης τάξεως τα γαγγλιακά κύτταρα, οι άξονες των οποίων σχηματίζουν το οπτικό νεύρο και στη συνέχεια οι οπτικές ίνες μεταδίδουν το ερέθισμα στα έξω γονατώδη σώματα, τα κύτταρα των οποίων παίζουν το ρόλο των νευραξόνων της τρίτης τάξης και αυτοί καταλήγουν στον οπτικό φλοιό.

Οι φωτοϋποδοχείς χωρίζονται σε ραβδία και κωνία. Τα κωνία δίνουν περισσότερο ευκρινή, λεπτομερή και έγχρωμη όραση ενώ τα ραβδία είναι προσαρμοσμένα για την όραση σε χαμηλό φωτισμό και στο άσπρο μαύρο.

Τα δίπολα κύτταρα είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά των μηνυμάτων από τους φωτοϋποδοχείς προς τα γαγγλιακά κύτταρα και τα αμακρόνια.

Οι άξονες από τα γαγγλιακά κύτταρα είναι αμύελοι, οι νευρικές ίνες γίνονται εμύελες αφού διέλθουν από το ηθμοειδές πέταλο.

Το κέντρο της ωχράς κηλίδας καταλαμβάνει το κεντρικό βοθρίο με διάμετρο 1,5mm. Το κεντρικό βοθρίδιο αποτελεί το πιο βαθύ σημείο του εντυώματος του κεντρικού βοθρίου το οποίο σχηματίζεται λόγω της ύπαρξης μόνο φωτοϋποδοχέων. Αυτή η περιοχή έχει την πιο λεπτομερή όραση στην οποία βλέπουμε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση κωνίων και την απουσία των ραβδίων. (Snell R. & Lemp M.)

1.3.2 Οπτικό νεύρο

Τα τέσσερα τμήματα του οπτικού νεύρου είναι το ενδοφθάλμιο (1mm), το ενδοκόγχιο (25mm), το ενδοαυλικό (5mm) και το ενδοκράνιο (10mm).

Το ενδοφθάλμιο τμήμα αποτελείται από τον οπτικό δίσκο και από το μέρος του νεύρου που είναι μέσα στον σκληρό χιτώνα. Η διάμετρος του οπτικού δίσκου είναι περίπου 1,5mm, έχει ωχρό-ρόδινο χρώμα και η θέση που καταλαμβάνει στον αμφιβληστροειδή είναι περίπου 3mm ρινικά από την ωχρά κηλίδα. Οι άξονες των γαγγλιακών κυττάρων δομούν τον οπτικό δίσκο, ο οποίος ονομάζεται και τυφλή κηλίδα λόγω της απουσίας ραβδίων και κωνίων.

Το μήκος του ενδοκόγχιου τμήματος έχει 25mm, η απόσταση ανάμεσα στο βολβό και στο οπτικό τρήμα είναι μικρότερη οπότε ο βολβός έχει την ικανότητα να κινείται ελεύθερα. Το μήκος του αυλού του οπτικού τρήματος είναι 5mm και αποτελεί την ενδοαυλική μοίρα του οπτικού νεύρου.

Ως ενδοκράνια μοίρα αναφέρεται το τμήμα εκείνο του οπτικού νεύρου που εγκαταλείπει το οπτικό τρήμα, συνεχίζει στον υπαραχνοειδή χώρο και καταλήγει στο οπτικό χίασμα. Η δομή του συμπεριλαμβάνει περίπου 1.200.000 εμμέλους άξονες, 90% των οποίων έχουν μικρή διάμετρο (1μm) αυτοί αποτελούν μέρος των γαγγλιακών κυττάρων νάνων που επικοινωνούν με τα κωνία, ενώ οι υπόλοιποι έχουν 2-10μm διάμετρο και έχουν προέλευση από τα γαγγλιακά κύτταρα που επικοινωνούν με τα ραβδία. Το οπτικό χίασμα έχει μήκος 8mm, είναι σημαντική δομή για τη διόφθαλμη όραση, καθώς οι ρινικές νευρικές ίνες του αμφιβληστροειδή χιάζονται και περνούν στην αντίπλευρη οπτική ταινία ενώ οι κροταφικές ίνες ακολουθούν αχίαστη πορεία στην ομόπλευρη οπτική ταινία.

Οι οπτικές ταινίες είναι συνέχεια του οπτικού χιάσματος οι οποίες ως επί το πλείστον καταλήγουν στο έξω γονατώδες σώμα και ένα μικρό ποσοστό στο άνω διδύμιο και στον προτετραδυμικό πυρήνα, που σχετίζονται με τα οπτοκινητικά αντανακλαστικά και το αντανακλαστικό στο φως, αντίστοιχα. Ενώ η ενσυνείδητη όραση αφορά τις ίνες που καταλήγουν στο έξω γονατώδες σώμα. Από τα έξω γονατώδη σώματα ξεκινούν την πορεία τους οι οπτικές ακτινοβολίες οι οποίες καταλήγουν στον ινιακό φλοιό. Το οπτικό νεύρο δεν έχει την ικανότητα να αναγεννάται διότι δεν διαθέτει κύτταρα Schwann. (Snell R. & Lemp M.)

1.4. Μιτοχόνδρια

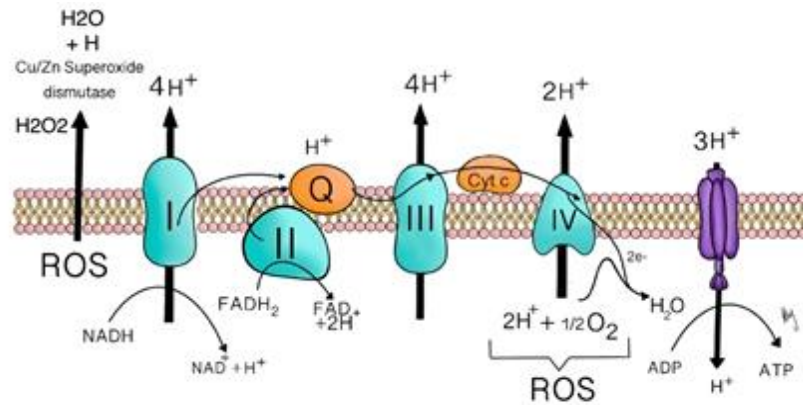
Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταροπλασματικά οργανίδια υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας (ATP) μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Κάθε κύτταρο περιέχει εκατοντάδες έως χιλιάδες μιτοχόνδρια και κάθε μιτοχόνδριο έχει πολλά αντίγραφα mtDNA. Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό DNA είναι κυκλικό και κωδικοποιεί 37 γονίδια. Ανάλογα με το ποσοστό της μετάλλαξης του mtDNA σε ένα κύτταρο αυτό μπορεί να είναι ομοπλασματικό ή ετεροπλασματικό. (Gonçalves, 2019)

Ομοπλασμία εννοείται όταν η μετάλλαξη ανευρίσκεται σε όλο το μιτοχονδριακό γονιδίωμα ενώ η ετεροπλασμία αφορά τη συνύπαρξη μεταλλαγμένων και φυσιολογικών γονιδίων. (Gonçalves, 2019)

Φυσιολογία των μιτοχονδρίων:

Η παραγωγή της ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης γίνεται στα συμπλέγματα πολυπεπτιδίων που δημιουργούν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Αυτά αποτελούνται από 5 υπομονάδες. Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων λαμβάνει μόρια NADH και FADH τα οποία προέρχονται από τον κύκλο του Krebs. Η απαραίτητη ενέργεια για την μεταφορά ηλεκτρονίων στην ATP συνθετάση προκύπτει μέσω μίας σειράς ανταλλαγής ηλεκτρονίων και οξειδωτικών αντιδράσεων. Η παραγωγή της ATP γίνεται μέσω της φωσφορυλίωσης της ADP από την ATP συνθετάση, η οποία διαδικασία διευκολύνεται μέσω 2 συνένζυμων, του συνένζυμου Q10 και το κυττοχρώματος C. Τέλος, ως απόβλητα δημιουργούνται δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) τα οποία βρίσκονται κυρίως στη μορφή σουπεροξειδίου και υπεροξειδίου. (Mejia-Vergara et al., 2020)

Fig. 1 Schematic of the respiratory chain. Complex I (NADH:CoQ10 oxidoreductase) is affected by the most common LOHN mutations. CoQ10 electrons from both complexes I and II. Later, the reduced form of CoQ10 donates those same electrons to complex III and cytochrome C. Complex IV (Cyt C-O₂ oxidoreductase) reduces superoxide to water with help of the two electrons donated by Cyt C



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της αναπνευστικής αλυσίδας. (Mejia-Vergara et al., 2020)

Η κλινική συμπτωματολογία σε μιτοχονδριακά νοσήματα συνήθως συσχετίζεται με το βαθμό της ετεροπλασμίας. Περίπου το 80% των mtDNA θα πρέπει να φέρουν την παθογόνο παραλλαγή ώστε να υπάρξει κλινική εκδήλωση των ασθενειών ή των βιοχημικών ελαττωμάτων.(Gonçalves, 2019)

1.5. Επιδημιολογία

Η πιο συχνή μιτοχονδριακά κληρονομούμενη ασθένεια είναι η LHON. Επιδημιολογικά στοιχεία δείχνουν πως στη βορειοανατολική Αγγλία πάσχουν 1 στους 27.000 ενώ από μία μετα-ανάλυση στην Ευρώπη φαίνεται πως πάσχουν 1 στις 45.000. (Carelli et al., 2017; Shemesh et al., 2022) Συνήθως, η ηλικία έναρξης είναι 15 με 35 χρονών και υπάρχει μία υπεροχή του αντρικού φύλου (80% έως 90%) σε σχέση με το γυναικείο για την εμφάνιση της ασθένειας. (Shemesh et al., 2022)

1.6. Παθοφυσιολογία

Οι μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό DNA οδηγούν στη μειωμένη παραγωγή ενέργειας και στην αύξηση του οξειδωτικού στρες οδηγώντας τα γαγγλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδή σε απόπτωση. Η υπομονάδα που κωδικοποιεί το σύμπλεγμα-I (CI) της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων υφίσταται μετάλλαξη η οποία οδηγεί σε δυσλειτουργία του συμπλέγματος. Το 90-95% των περιπτώσεων της LHON συμβαίνουν λόγω μετάλλαξης σε ένα από τα παρακάτω γονίδια: MT-ND1, MT-ND4, και MT-ND6. Οι πιο συχνές είναι η G3460A στο ND1, η G11778A στο ND4, και η T14484C στο ND6. Σαφώς, υπάρχουν πολλές άλλες σπανιότερες μεταλλάξεις και

συνήθως αφορούν την ανταλλαγή ενός αμινοξέος στο CI των μιτοχονδρίων. (Manickam et al., 2017)

Το γονίδιο MT-ND1 είναι σημαντικό για τη δημιουργία της NADH αφυδρογονάσης 1, το MT-ND4 για την NADH αφυδρογονάση 4 και το MT-ND6 για την NADH αφυδρογονάση 6, οι οποίες όλες αποτελούν μέρος του συμπλέγματος I. (Manickam et al., 2017)

Οι φορείς της LHON έχουν αμφιβληστροειδικά γαγγλιακά κύτταρα με μειωμένη ικανότητα αποθεμάτων ενέργειας, ωστόσο προσπαθούν να επανορθώσουν μέσω αύξησης του αριθμού των μιτοχονδρίων τους και αποδοτικής βιογένεσης. Σε κάποιες περιπτώσεις η ικανότητα αποθέματος ξεπερνιέται από το μεταβολικό στρες, το οποίο επιδεινώνεται από εξωτερικούς παράγοντες που αυξάνουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Παραδείγματα αυτών των εξωτερικών παραγόντων αποτελούν το κάπνισμα και το αλκοόλ με μεγαλύτερη επιδείνωση όταν συνυπάρχουν καθώς λειτουργούν αθροιστικά. Άλλοι εξωτερικοί παράγοντες είναι η έκθεση σε τοξίνες, μέταλλα και σε ορισμένα φάρμακα. (Mejia-Vergara et al., 2020)

Τα εναπομείναντα μιτοχόνδρια προσπαθούν να διατηρήσουν την ενέργεια που απαιτείται. Η βιογένεση νέων μιτοχονδρίων απαιτεί ενέργεια αλλά σε καταστάσεις με χαμηλή ενέργεια σταματάει η μεταφορά πρωτεϊνών στις απολήξεις των συνάψεων, με αποτέλεσμα τα μιτοχόνδρια να μην μπορούν να συμβαδίσουν ανάλογα με τις απαιτήσεις που προκύπτουν. Η συσσώρευση των ROS επιδεινώνεται. Σε συνδυασμό με την απελευθέρωση του κυττοχρώματος C στο σώμα και την ύπαρξη ασβεστίου, ενεργοποιούν το μονοπάτι της κασπάσης η οποία οδηγεί στην απόπτωση των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδούς που έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της όρασης που συναντάται στους ασθενείς με LHON. (Mejia-Vergara et al., 2020)

1.7. Μεταλλάξεις στη LHON

Λόγω μετάλλαξης στο γονίδιο MT-ND1 υπάρχει συσσώρευση ροτενόνης, η οποία λειτουργεί ως αποκλειστής του CI. Εκτός από τη μετάλλαξη G3460A που είναι η πιο συχνή στο γονίδιο MT-ND1 υπάρχουν επίσης οι σημειακές μεταλλάξεις m.4171C>A/pL289M, m.3700G>A/p.A132T, και m.3733G>A-C/p.E143K-Q. Σε ασιατικές χώρες όπως η Κίνα, η Ταϊλάνδη και η Ιαπωνία το 90% των ασθενών με LHON έχουν τη σημειακή μετάλλαξη G11778A στο MT-ND4. Άλλες μεταλλάξεις στο γονίδιο ND4 αποτελούν οι m.11204T>C, m.11430C>G, m.11213T>G, m.11447G>A και m.10934G>A. Η πιο συχνή μετάλλαξη στο γονίδιο MT-ND6 είναι

η T14484C, η οποία συνήθως είναι ομοπλασμική αλλά με χαμηλό επίπεδο διεισδυτικότητας. Οι m.14495A>G, m14568C>T, m14482C>G/A είναι κάποιες από τις σημειακές μεταλλάξεις στο ND6, καθώς και άλλες δευτερεύουσες μεταλλάξεις αποτελούν οι m.3497C>T και m.14502T>C. Από τις 3 κυριότερες μεταλλάξεις, η T14484C είναι αυτή που δείχνει μεγάλη ανάκτηση της όρασης.(Manickam et al., 2017)

1.8.Κλινικά συμπτώματα και σημεία

Η LHON χαρακτηρίζεται από αμφοτερόπλευρη ανώδυνη απώλεια όρασης, η οποία στα πρώτα στάδια επηρεάζει τον έναν οφθαλμό και στη συνέχεια τον άλλον. Ως επί το πλείστον υπάρχει οικογενειακό ιστορικό μητρικής πρόελευσης, χωρίς να αποκλείονται οι σποραδικές περιπτώσεις. Οι άρρενες φορείς εμφανίζουν συμπτώματα πιο συχνά από τα θήλεα. Στο 25% των ασθενών η απώλεια της όρασης είναι οξεία και αμφοτερόπλευρη ή διαδοχική μέσα σε διάστημα 2 μηνών όπως στο 75%. (Harding et al. 1995). Συνήθως, οι ασθενείς εμφανίζουν την ασθένεια στην 2η και 3η δεκαετία, με το 95% των περιπτώσεων να συμβαίνει πριν τα 50 (Yu-Wai-Man et al. 2021). Σε αυτό το στάδιο συναντάμε διάταση των αμφιβληστροειδικών αγγείων, παραμόρφωση του οπτικού νεύρου και αμφιβληστροειδικό οίδημα (Yen et al. 2006), ωστόσο υπάρχουν και περιπτώσεις χωρίς παθολογικά σημεία (Riordan- Eva and Harding 1995). Ορισμένες φορές η εξέλιξη της LHON μπορεί να διαρκεί 6 μήνες ή και περισσότερο (Nikoskelainen et al. 1996).

Στους συμπτωματικούς ασθενείς της LHON η εξέλιξη της απώλειας της όρασης στις αρχικές εβδομάδες ή/ και μήνες είναι υποξεία και μπορεί να διαρκέσει κάποιες ημέρες, εβδομάδες ή μήνες (Carelli et al., 2017) Η χειρότερη οπτική οξύτητα, δηλαδή το ναδίρ της οπτικής οξύτητας συμβαίνει σε 4-6 μήνες, όπου και σταθεροποιείται. Ωστόσο κάποιες άλλες παράμετροι της όρασης είναι πιθανό να εξελίσσονται ακόμα, όπως τα οπτικά πεδία (Nakamura & Yamamoto, 2000; *Visual Recovery in Patients with Leber's Hereditary Optic Neuropathy and the 11778 Mutation - PubMed*, n.d.) και το OCT (Balducci et al., 2016; Barboni et al., 2005, 2010; Moster et al., 2016) και συνήθως φτάνουν σε πλατό μέσα σε 1 χρόνο από την έναρξη της απώλειας της όρασης. Η περίοδος της ασθένειας από 6 μήνες έως 12 ονομάστηκε δυναμική. Η χρόνια φάση της ασθένειας όπου οι παράμετροι της όρασης έχουν πλέον μειωθεί και σταθεροποιηθεί είναι περίπου στο 1 έτος.(Carelli et al., 2017; Newman et al., 2020)

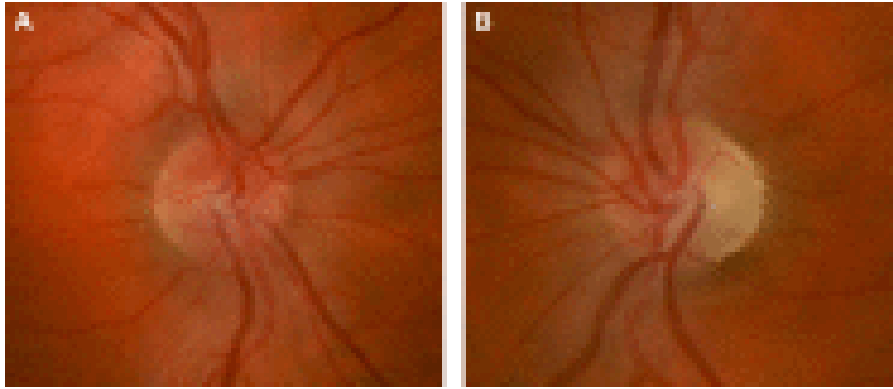
Τα κλινικά στάδια της LHON μπορούν να χωριστούν σε 4 κατηγορίες: 1. Ασυμπτωματική κατάσταση, 2. Υποξεία (λιγότερο από 6 μήνες από την έναρξη των συμπτωμάτων) , 3. Δυναμική (6-12 μήνες) και 4. Χρόνια (περισσότερο από 12 μήνες). (Carelli et al., 2017)

Ο αμφιβληστροειδής στην προσυμπτωματική φάση εμφανίζει περιθηλαία τηλαγγειεκτατικά αγγεία και οίδημα στο RNFL. Το οπτικό νεύρο μπορεί να εμφανίσει ήπια βλάβη με: “ 1.απώλεια της όρασης που προσβάλλει κυρίως το κόκκινο-πράσινο σύστημα, 2. μειωμένη αντίθεση ευαισθησίας, και 3. υποκανονικό ηλεκτροαμφιβληστροειδογράφημα και οπτικά προκλητά δυναμικά. (Yu-Wai-Man & Chinnery, 2021)

Στην οξεία φάση οι ασθενείς παρουσιάζουν κεντρική θόλωση της όρασης στον έναν οφθαλμό και προσβολή του άλλου μέσα σε μερικές εβδομάδες ή μήνες. Μέσα σε 1 χρόνο προσβάλλονται και οι δύο οφθαλμοί σε ποσοστό 97% των ασθενών. Είναι πολύ χαρακτηριστικό οι πάσχοντες να έχουν ένα κεντρικό ή κεντροκυφλικό σκότωμα το οποίο καθώς μεγαλώνει σε μέγεθος και πυκνότητα χειροτερεύει και η οπτική οξύτητα, η οποία φτάνει σε επίπεδο μέτρησης δακύλων ή και χειρότερα.(Yu-Wai-Man & Chinnery, 2021)

Στη χρόνια φάση το οπτικό νεύρο είναι ατροφικό (μέσα σε 6 εβδομάδες από την απώλεια της όρασης), υπάρχει σημαντική λέπτυνση του RNFL και ένα πυκνό κεντρικό ή κεντροκυφλικό σκότωμα.(Yu-Wai-Man & Chinnery, 2021)

Άλλα, μη οφθαλμολογικά συμπτώματα που συναντώνται είναι ο ορθοστατικός τρόμος, η περιφερική νευροπάθεια, οι κινητικές δυσλειτουργίες, MS-like ασθένεια, μη συγκεκριμένη μυοπάθεια και καρδιακές αρρυθμίες.(Yu-Wai-Man & Chinnery, 2021)



Εικόνα 2. (Α). Το δεξί οπτικό νεύρο δείχνει υπεραϊμία, ασάφεια των ορίων της οπτικής θηλής και υπέργερση του οπτικού νεύρου σε ασθενή με LHON οξείας φάσης. (Β) Στο αριστερό νεύρο είναι εμφανής η κροταφική ατροφία σε απώλεια όρασης προ 6 μηνών.(Meyerson et al., 2015)

1.9. Διάγνωση

Υπάρχει ένα μεγάλο φάσμα οξέων και χρόνιων οπτικών νευροπαθειών, γι' αυτό το λόγο είναι δύσκολο να ανιχνευθεί η LHON. Ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δίνεται στο ατομικό ιστορικό του ασθενή, στο οικογενειακό του ιστορικό, καθώς και στα ευρήματα από την κλινική εξέταση, τη βυθοσκόπηση, το OCT και από μία MRI. Γενετικό τεστ για παθολογικές παραλλαγές στο μιτοχονδριακό DNA, ένα πάνελ πολλών γονιδίων, ή πλήρης αλληλούχιση του mtDNA. Θα πρέπει να διενεργείται και ένα ηλεκτροκαρδιογράφημα σε ασθενείς με LHON λόγω πιθανών καρδιακών ανωμαλιών. (Stramkauskaitė et al., 2022)

1.10. Διαφορική διάγνωση

Η μεγαλύτερη ομοιότητα της LHON είναι με την οπτική νευρίτιδα και με την κυρίαρχη οπτική ατροφία.

Η **οπτική νευρίτιδα** χαρακτηρίζεται από επώδυνη απώλεια όρασης, το άλγος αναφέρεται κατά την οφθαλμοκινητικότητα, κεντρικό σκότωμα, απώλεια χρωματικής αντίληψης, η έναρξη είναι σε νεαρή ηλικία αλλά περισσότερο προσβάλλονται οι γυναίκες (3:1), τα οπτικά προκλητά δυναμικά μπορεί να δείξουν μία καθυστέρηση στις απαντήσεις και μειωμένο εύρος P100. Η οπτική νευρίτιδα έχει ισχυρή συσχέτιση με τη πολλαπλή σκλήρυνση, οπότε θα πρέπει πάντα να διενεργείται MRI εγκεφάλου. Ωστόσο έχει καλή απάντηση στην μεθυλπρεδνιζολόνη.

Στην **κυρίαρχη οπτική ατροφία** η απώλεια της όρασης συμβαίνει στις πρώτες δύο

δεκαετίες της ζωής αλλά συνήθως οι ασθενείς στα πρώτα στάδια είναι ασυμπτωματικοί. Η οπτική οξύτητα στην αρχική μέτρηση μπορεί να είναι 0.6 ή και καλύτερα, η πρόγνωση της όρασης ποικίλλει αλλά συνήθως είναι καλύτερη από αυτή της LHON. Το 50-60% των ασθενών έχουν μία μετάλλαξη στο OPA-1 (3q28-q29). Συχνά οι ασθενείς ανευρίσκουν την ασθένεια είτε λόγω αμφοτερόπλευρης οπτικής ατροφίας είτε λόγω οικογενειακού ιστορικού.

Στην **ισχαιμική οπτική νευροπάθεια** στο οξύ στάδιο υπάρχει οίδημα στο οπτικό νεύρο και στη συνέχεια στη χρόνια φάση το νεύρο γίνεται ατροφικό. Σε ασθενείς άνω των 55 πρέπει να ζητείται μία εξέταση CRP και ΤΚΕ καθώς και επικοινωνία με ρευματολόγο για το αν θα γίνει βιοψία της κροταφικής αρτηρίας ή όχι. Εάν υπάρχει αμφοτερόπλευρο οίδημα στα οπτικά νεύρα θα πρέπει να τεθεί η υποψία ενδοκράνιας υπέρτασης, τα συμπτώματα της οποίας συμπεριλαμβάνουν την κεφαλαλγία, τάση προς έμετο, ζάλη και έμετος. Σε επικοινωνία με κάποιον νευρολόγο θα πρέπει να γίνει κάποια διαγνωστική εξέταση.

Το **γλαύκωμα φυσιολογικής πίεσης** χαρακτηρίζεται από απώλεια όρασης, λέπτυνση του ΝΑΔ στο OCT , παράκεντρα ελλείμματα αλλά η εμφάνισή της γίνεται σε ασθενείς 64 ετών και άνω. Στα οπτικά πεδία συχνά ανευρίσκονται τοξοειδή ελλείμματα, η προσβολή του κατώτερου ΝΑΔ καθώς και η λέπτυνση του κατώτερου νεύρου το διαχωρίζουν από τη LHON.

Υπάρχει επίσης η **διατροφική οπτική νευροπάθεια** η οποία συμβαίνει λόγω ελλείψεων κάποιων βιταμινών ή ακόμα και από *anorexia nervosa*, αλκοολισμό, γαστρεντερικά προβλήματα ή επεμβάσεις.

Η **τοξική οπτική νευροπάθεια** είναι απόρροια της χρήσης εθαμβουτόλης, λινεζολίδης , γλωραμφαινικόλης , ερυθρομυκίνης και άλλων. Το ιστορικό του ασθενούς ιατρικό και κοινωνικό μπορούν να βοηθήσουν τον θεράποντά του, όμως πάντα σε μία οπτική νευροπάθεια πρέπει να διενεργείται μια μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου και κόγχων.

Συμπιεστικές ή απομυελινωτικές βλάβες μπορεί να προκαλέσουν οίδημα στα οπτικά νεύρα ή και ατροφικά οπτικά νεύρα. Αλλαγές στην προσωπικότητα, στη μνήμη, κεφαλαλγία και αλλαγές διάθεσης μπορούν να προκληθούν λόγω συμπιεστικών βλαβών. Γι' αυτό μία μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου και κόγχων μπορούν να μας αποκαλύψουν τη διάγνωση. (Stramkauskaitė et al., 2022)

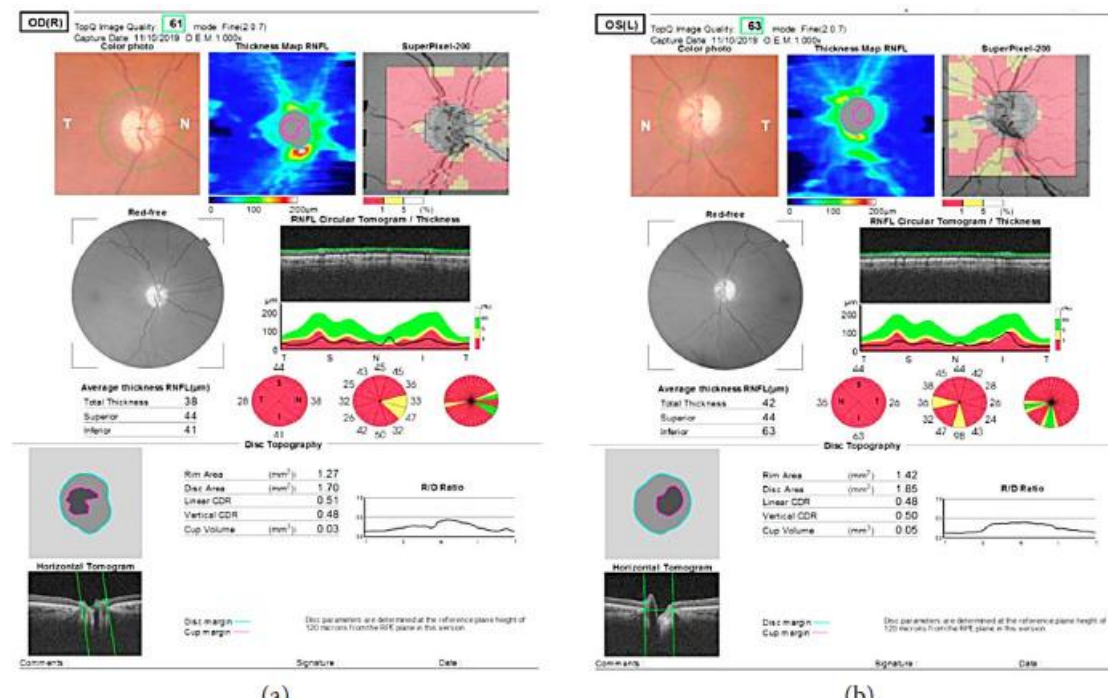
1.11. Μεταβολές στις παραμέτρους διαγνωστικών μεθόδων

Οπτική τομογραφία συνοχής (OCT)

Οξεία φάση: τα τεταρτημόρια που εμφανίζουν πύκνωση της στιβάδας των νευρικών αξόνων αρχικά είναι το κροταφικό και το κατώτερο ενώ ακολουθούν το ανώτερο και το ρινικό. Αυτό εξηγείται και από την πρώιμη προσβολή του θηλοωχρικού δεματίου των RGCs.

Χρόνια φάση: η πυκνότητα του RNFL μειώνεται. (Εικόνα 3)

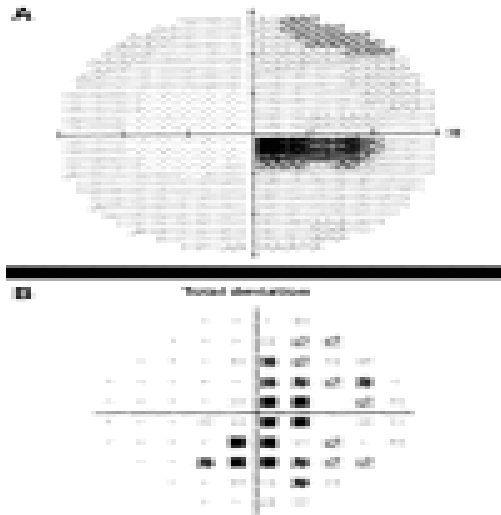
Η περιοχή της ωχράς μπορεί να παρουσιάσει μείωση της πυκνότητάς της πριν τη μείωση του RNFL. Έτσι, φαίνεται πως το OCT είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για την παρακολούθηση της πορείας της ασθένειας. (Meyerson et al., 2015)



Εικόνα 3. Λέπτυνση της στιβάδας των νευρικών αξόνων του αμφιβληστοριεδούς (RNFL) στο OCT. (Stramkuskaitė et al., 2022)

Οπτικά πεδία

Το οπτικό πεδίο συνήθως εμφανίζει ένα κεντρικό ή κεντροτυφλικό σκότωμα.(Εικόνα 4). (Meyerson et al., 2015)



Εικόνα 4. 30-2 HVF κεντροτυφλικό σκότωμα στο δεξί μάτι ενός ασθενή με οξεία απώλεια όρασης λόγω της LHON.(Meyerson et al., 2015)

Περαιτέρω έλεγχος

Η εκφύλιση των ινών του οπτικού νεύρου φαίνεται από τα παθολογικά αποτελέσματα στα οπτικά προκλητά δυναμικά (VEP) ασθενών με LHON και η απώλεια των γαγγλιακών κυττάρων του αμφιβληστροειδή στο ηλεκτροαμφιβληστροειδογράφημα (ERG).(Meyerson et al., 2015)

Η μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου και οφθαλμών συνήθως δεν παρουσιάζει παθολογικά αποτελέσματα.(Meyerson et al., 2015)

1.12. Γενετική συμβουλευτική

Η LHON κληρονομείται αποκλειστικά από τη μητέρα αφού είναι επακόλουθο παραλλαγών του μιτοχondριακού DNA. Οι άρρενες είτε είναι φορείς μίας πρωταρχικής παθογόνου παραλλαγής είτε ασθενείς λόγω αυτής δεν έχουν την ικανότητα να κληροδοτήσουν την παραλλαγή στους απογόνους τους, ενώ τα θήλεα την κληροδοτούν σε όλους. Οικογενειακό ιστορικό απώλειας όρασης υπάρχει σε περίπου 60% των οικογενειών και είναι μητρικής προέλευσης. Η γενετική συμβουλευτική είναι δύσκολη και εξαρτάται από το φύλο και την ηλικία, καθώς η διεισδυτικότητα μίας παραλλαγής εξαρτάται από αυτά.

Μέλη της οικογένειας

- Ο πατέρας δεν έχει ρίσκο
 - Η μητέρα συνήθως φέρει το γονίδιο (είτε είναι ασθενής είτε όχι)
- Υπάρχει οικογενειακό ιστορικό (μητρικής προέλευσης) στο 60% των οικογενειών

- Όλα τα αδέρφια του ασθενή έχουν την παθολόγο παραλλαγή (είτε είναι ασθενείς είτε όχι)

Η διεισδυτικότητα του παθολόγου γονιδίου μπορεί να ποικίλλει ανάμεσα στα αδέρφια

Απόγονοι

- Ένας άντρας που φέρει το μεταλλαγμένο γονίδιο δεν έχει την ικανότητα να το κληροδοτήσει στους απογόνους του
- Αντιθέτως, η γυναίκα θα το κληροδοτήσει σε όλους, ωστόσο αν έχει ετεροπλασμία, το ποσοστό που θα δώσει στους απογόνους της μπορεί να είναι μικρότερο και κατ'έκταση και το ρίσκο τους

Η ύπαρξη της παθολόγου παραλλαγής δεν μπορεί να προβλέψει εάν η νόσος θα εκδηλωθεί, τη σοβαρότητα, το ρυθμό της εξέλιξής της και την ηλικία εμφάνισής της

Μία παθολόγος παραλλαγή προσδίδει κίνδυνο εφόρου ζωής, ωστόσο ο κίνδυνος εμφάνισης καθορίζεται κυρίως από το φύλο και την ηλικία, π.χ. ένας άνδρας 18 ετών, με θετικό αποτέλεσμα έχει κίνδυνο εφόρου ζωής περίπου 50% για την εμφάνιση της LHON. Επειδή υπάρχει το ενδεχόμενο απώλειας της όρασης σε οποιαδήποτε ηλικία, να μεν ο κίνδυνος εμφάνισης μειώνεται με την πάροδο της ηλικίας αλλά ποτέ δεν πέφτει στο μηδέν. Επίσης, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η διεισδυτικότητα της ίδιας παθολόγου παραλλαγής μπορεί να διαφέρει ανάμεσα σε διαφορετικές οικογένειες όπως επίσης μπορεί να διαφέρει και ανάμεσα στους κλάδους της ίδιας οικογένειας.

Είναι συνετό σε ένα ζευγάρι που σχεδιάζει να κάνει οικογένεια, πριν την εγκυμοσύνη να καθοριστεί το γενετικό ρίσκο και να γίνει μία συζήτηση για προγεννητικό/προεμφυτευτικό έλεγχο. Είναι σημαντικό να δίδεται γενετική συμβουλή σε νέους ενήλικες πάσχοντες ή σε αυτούς με ρίσκο για εμφάνιση της ασθένειας.

Ένα θετικό αποτέλεσμα κατά τη διάρκεια ενός προγεννητικού ελέγχου είναι δύσκολο να ερμηνευτεί με ακριβεία για τους εξής λόγους:

- Η πλειονότητα των μητέρων είναι ομοπλασμική αλλά για τις μητέρες που εμφανίζουν ετεροπλασμία ενδέχεται το φορτίο που ανευρίσκεται στα αμνιοκύτταρα και στις χοριονικές λάχνες να μην αντιστοιχεί σε αυτό που ανευρίσκεται στους ιστούς εμβρύων ή ενηλίκων
- Η ύπαρξη της παθολόγου παραλλαγής δεν μπορεί να προβλέψει με ακρίβεια το εάν η ασθένεια θα εκδηλωθεί, την ηλικία έναρξης, το πόσο σοβαρή θα είναι και το ρυθμό της πρόοδου. (Yu-Wai-Man & Chinnery, 2021))

1.14. Φυλετική προτίμηση

Οι άντρες προσβάλλονται 4 με 5 φορές περισσότερο από ότι οι γυναίκες. Αυτή η ανισορροπία ανάμεσα στα δύο φύλα μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη των οιστρογόνων. Υπάρχει μία θεωρία ότι η αύξηση της βιογένεσης των μιτοχονδρίων λόγω των οιστρογόνων λειτουργεί προστατευτικά. Επίσης, χωρίς να έχει χαρτογραφηθεί κάποια συγκεκριμένη τοποθεσία στο χρωμόσωμα X πιστεύεται πως αυτό αλλάζει τη μιτοχονδριακή απάντηση. Πλέον θεωρείται ακόμα πως και το πυρηνικό DNA παίζει μεγαλύτερο ρόλο από ότι πιστευόταν παλιά. Σε γυναίκες με LHON που έχουν λάβει θεραπεία ορμονικής αποκατάστασης φαίνεται πως υπήρχαν θετικά αποτελέσματα. Επιπροσθέτως, έχουν γίνει *in vitro* μελέτες στις οποίες φαίνεται ότι η διέγερση των E2 υποδοχέων έχει κάποια επιτυχία στα LHON cybrids. (Mejia-Vergara et al., 2020)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΆΛΛΕΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

2.1.Αντιοξειδωτική θεραπεία

Οι κληρονομικές μιτοχονδριακές ασθένειες (IMD) έχουν αυξημένο οξειδωτικό στρες, αυτό έχει οδηγήσει τους επιστήμονες σε θεραπευτικές στρατηγικές οι οποίες έχουν ως στόχο την μείωση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και την αύξηση της μιτοχονδριακής αναπνοής. Διάφορα μόρια έχουν χρησιμοποιηθεί, με διαφορετικούς συνδιασμούς βιταμινών (B2, B3, B12, C, E, και φολικό οξύ), ουβικινόνη, και άλλα συμπληρώματα (π.χ. άλφα-λιποϊκό οξύ, καρνιτίνη, κρεατίνη, L-αργινίνη, γλουταθειόνη και dichloacetate (διχλωροοξικό)).(Hage & Vignal-Clermont, 2021)

2.1.1.Ιδεβενόνη

Η πιο πολλά υποσχόμενη θεραπεία είναι αυτή με την οικογένεια της ουβικινόνης, η οποία συμπεριλαμβάνει το συνένζυμο Q10. Ωστόσο, το συνένζυμο Q10 όταν λαμβάνεται δια του στόματος δεν έχει την ικανότητα να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Για να ξεπεραστεί αυτό το εμπόδιο, δημιουργήθηκε η ιδεβενόνη (Raxone), η οποία είναι ένα συνθετικό ανάλογο του συνένζυμου Q10, η οποία έχει αντιοξειδωτική δράση και μπορεί να παρακάμπτει το δυσλειτουργικό σύμπλεγμα I της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. (Haefeli et al., 2011; Hage &

Vignal-Clermont, 2021) Η χορήγησή της έλαβε έγκριση τον Σεπτέμβριο του 2015 στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Η θεραπεία αυτή απευθύνεται σε ασθενείς με LHON, οι οποίοι είναι 12 ετών και άνω. Η σύσταση για τη θεραπεία με ιδεβενόνη για ασθενείς με LHON είναι εντός έτους από την έναρξη των συμπτωμάτων στο δεύτερο μάτι. Η δοσολογία είναι ιδεβενόνη 3x300 mg/d για τουλάχιστον ένα χρόνο και η θεραπεία πρέπει να συνεχίζεται σε όσους υπάρχει ανταπόκριση μέχρι να φτάσει ένα χρόνο επίπεδο πλατό. (Catarino & Klopstock, 2017)

2.2.EPI-743

Το EPI-743 είναι μία παρα-βενζοκινόνη, η οποία έχει την ικανότητα να μειώνει το οξειδωτικό στρες και μάλιστα έχει αποδειχτεί ότι είναι 1.000 φορές πιο αποδοτική από την ιδεβενόνη. (Hage & Vignal-Clermont, 2021) Το 2012 δημοσιεύτηκαν τα αποτελέσματα της χορήγησης της EPI-743 σε 5 ασθενείς με οξεία απώλεια όρασης λόγω της LHON, όπου έδειξαν ότι οι 4 από αυτούς είχαν βελτίωση στην όραση. (Hage & Vignal-Clermont, 2021; Sadun et al., 2012) Η συγκεκριμένη ουσία έχει χρησιμοποιηθεί και σε άλλες κληρονομικές ασθένειες εκτός της LHON, στις οποίες φαίνεται πως είχε θετική επίδραση. (Enns et al., 2012; Hage & Vignal-Clermont, 2021; Martinelli et al., 2012)

2.3.Κυκλοσπορίνη

Η κυκλοσπορίνη Α έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει τον κυτταρικό θάνατο. (Hage & Vignal-Clermont, 2021) Στην προσπάθεια να εκτιμηθεί η αποδοτικότητά της ως προφυλακτικού παράγοντα στην πρόληψη της εμπλοκής και του δεύτερου οφθαλμού πραγματοποιήθηκε μία μελέτη με 5 ασθενείς. Αυτοί έπρεπε να φέρουν μία επιβεβαιωμένη πρωταρχική μετάλλαξη της LHON και να έχουν ετερόπλευρη οπτική νευροπάθεια εντός 6 μηνών από την έναρξη της θεραπείας. Η δοσολογία ήταν 2.5/mg/kg την ημέρα από το στόμα και η χορήγηση έγινε για 9 μήνες από την ημέρα της ένταξης ή μέχρι να προσβληθεί και το άλλο μάτι. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η χορήγηση της κυκλοσπορίνης Α στη συγκεκριμένη δοσολογία δεν εμπόδισε την εξέλιξη της ασθένειας ώστε να μην εμπλακεί και ο έτερος οφθαλμός. (Hage & Vignal-Clermont, 2021; Leruez et al., 2018)

2.4.Βριμονιδίνη

Η βριμονιδίνη είναι ένας α -2 αγωνιστής. Η χρήση της συστήνεται για την μείωση της ΕΟΠ στο γλαύκωμα ανοιχτής γωνίας εδώ και πολλά χρόνια. (Wilensky, 1996) Σε καταστάσεις όπου υπάρχει οφθαλμική υπερτονία ή ισχαιμία στον αμφιβληστροειδή φαίνεται πως έχει νευροπροστατευτική δράση μειώνοντας την απόπτωση. Αυτή η δράση έχει φανεί σε πειραματικές μελέτες σε αρουραίους. (Hage & Vignal-Clermont, 2021; Wheeler et al., 2003) Σε μία δοκιμή με 9 ασθενείς που είχαν μία από τις πρωταρχικές μεταλλάξεις της LHON και ετερόπλευρη απώλεια όρασης χρησιμοποιήθηκε ως τοπική αγωγή η βριμονιδίνη για την προφύλαξη του έτερου οφθαλμού, ωστόσο τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά. (Hage & Vignal-Clermont, 2021; Newman et al., 2005)

2.5.Οιστρογόνα

Η φυλετική προτίμηση της LHON προς τους άντρες καθώς και η αυξημένη εμφάνιση της ασθένειας σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση δείχνουν πως τα οιστρογόνα έχουν έναν νευροπροστατευτικό χαρακτήρα. Υποδοχείς οιστρογόνων (ERβ) φαίνεται πως υπάρχουν στα μιτοχόνδρια των γαγγλιακών αμφιβληστροειδικών κυττάρων και με την ενεργοποίησή τους αυξάνεται η αντιοξειδωτική ενζυμική παραγωγή, προάγεται η μιτοχονδριακή βιογένεση και αυξάνονται τα αντίγραφα του μιτοχονδριακού DNA. Αυτή η διαδικασία μειώνει το ρυθμό της απόπτωσης. Η αγωγή με οιστρογόνα σε προσυμπτωματικούς ασθενείς είναι υπό σκέψη και κυρίως σε γυναίκες που βρίσκονται σε ηλικία εμμηνόπαυσης. (Hage & Vignal-Clermont, 2021; Pisano et al., 2015)

2.6.Προοπτικές για μελλοντικές θεραπείες

Μία πιθανή θεραπεία θα μπορούσε να έχει ως στόχο την αύξηση της βιοενέργειας των μιτοχονδρίων μέσω διατροφικών συνηθειών, όπως είναι η κετογενική δίαιτα, η οποία φαίνεται πως έχει νευροπροστατευτικό ρόλο καθώς αυξάνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού. (Emperador et al., 2019; Hage & Vignal-Clermont, 2021; Storoni et al., 2019)

Επίσης, έχει μελετηθεί η θεραπεία με βλαστοκύτταρα στη SCOTS (Stem Cell Ophthalmology Treatment Study), η οποία χορήγησε αυτόλογα βλαστοκύτταρα σε 5 ασθενείς με LHON. Η βελτίωση που παρατηρήθηκε ήταν μέχρι 35 γράμματα σύμφωνα με τον πίνακα ETDRS και σύμφωνα με τον πίνακα Snellen από αντίληψη

κινούμενης χειρός σε 20/200 και από μέτρηση δακτύλων σε 20/100, υπήρξε ακόμα βελτίωση στα οπτικά πεδία και φάνηκε επίσης πύκνωση στη στιβάδα των νευρικών αξόνων του οπτικού νεύρου και της ωχράς κηλίδας. Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά όσον αφορά την θεραπεία των ασθενών με LHON με αυτόλογα βλαστοκύτταρα. (Weiss et al., 2016) Μία ακόμα μελέτη με βάση τη θεραπεία με βλαστοκύτταρα βρίσκεται σε εξέλιξη, η SCOTSI, η οποία ξεκίνησε το 2017 και ακόμα βρίσκεται σε κατάσταση στρατολόγησης ασθενών. (*Stem Cell Ophthalmology Treatment Study II - Full Text View - ClinicalTrials.Gov*, n.d.)

Στην κληρονομική οπτική νευροπάθεια Leber ένας σημαντικός αριθμός γαγγλιακών κυττάρων καταστρέφονται με αποτέλεσμα την επακόλουθη βλάβη του οπτικού νεύρου. Ωστόσο, με την αναγεννητική ιατρική θα μπορούσε να επιτευχθεί η αντικατάσταση αυτών των κυττάρων. Ένας τρόπος είναι η χρήση πολυδύναμων επαγόμενων βλαστοκυττάρων (iPSC), μέχρι στιγμής έχουν δημιουργηθεί πολλαπλές σειρές από τους ινοβλάστες των ασθενών με LHON, ωστόσο η οργάνωση των κυττάρων στον αμφιβληστροειδή είναι διαφορετική από αυτή των (iPSC), και γι αυτό το λόγο γίνονται προσπάθειες δημιουργίας 3D περιβάλλοντος με αμφιβληστροειδικά κύτταρα εκτός των RGCs, επιτρέποντας στα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα να αλληλεπιδρούν με άλλα συστατικά του αμφιβληστροειδικού ιστού. (Hage & Vignal-Clermont, 2021)

«Η μιτοχονδριακή θεραπεία αποκατάστασης είναι μία τεχνολογία που αποσυνδέει τη μιτοχονδριακή κληρονομία από την κληρονομία του πυρηνικού DNA.» Το 2016 οι Hyslop et al ανέφεραν την πρώτη προκλινική δοκιμή, στην οποία έγινε μεταφορά του προπυρήνα ενός ζυγωτού σε ένα άλλο εκπυρηνωμένο. Η τεχνική αυτή φαίνεται πως αποκατέστησε εν μέρει την μιτοχονδριακή λειτουργία. Ωστόσο, η MRT δεν έχει χρησιμοποιηθεί στη LHON. Οι Zhang et al ανέφεραν το 2017 τη γέννηση του πρώτου ανθρώπου με χρήση του MRT στο γονιδίωμα του, η ασθένεια ήταν θανατηφόρος και θα επέφερε το θάνατο στο έμβρυο μέσα στη μήτρα. Παρόλο που το MRT είναι πολλά υποσχόμενο, η χρήση του εγείρει κάποια ηθικά διλήμματα καθώς υπάρχει παρέμβαση στους ίδιους τους γαμέτες, όπως και με τις τεχνικές κλωνοποίησης. (Hage & Vignal-Clermont, 2021)

Επεξεργασία του μιτοχονδριακού γονιδίου

Η χρήση νουκλεασών δακτυλίων ψευδαργύρου (ZFNs) και οι τελεστές ενεργοποίησης μεταγραφικής δράσης (MitoTALENs) αποτελούν τεχνικές επεξεργασίας γονιδίων οι οποίες φαίνεται πως έχουν την ικανότητα να απομακρύνουν το μεταλλαγμένο mtDNA και να αλλάζουν την ετεροπλασμία. (Morgan et al., 2022; Spiegel & Sadun, 2022) Ένας επεξεργαστής βάσης DNA με μιτοχονδριακό στόχο θα μπορούσε να αλλάξει το μεταλλαγμένο DNA στο φυσιολογικό mtDNA. Σε μία σειρά ανθρώπινων κυττάρων πραγματοποιήθηκε μία τέτοια τεχνική, χρησιμοποιώντας TALEDs (TALE-linked adenine deaminases), η οποία κατάφερε να επεξεργαστεί την αντικατάσταση βάσης A σε G σε διαφορετικές τοποθεσίες στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. (Barrera-Paez & Moraes, 2023; Cho et al., 2022; Spiegel & Sadun, 2022) Η συγκεκριμένη μεθοδολογία απέχει πολύ από την κλινική πράξη αλλά αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη τεχνική που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί έναντι παθογόνων μεταλλάξεων του mtDNA, όπως και στη LHON. (Spiegel & Sadun, 2022)

Η θεραπεία με φως χρησιμοποιεί τα φωτόνια από το Near Infrared Light (NIR), τα οποία μπορούν να προάγουν την παραγωγή μιτοχονδριακής ενέργειας καθώς απορροφούνται από την οξειδάση του κυττοχρώματος c. Το NIR έχει την ικανότητα να αποκαθιστά τη λειτουργικότητα των μιτοχονδρίων που έχουν καταστραφεί, να παρεμποδίσει την απόπτωση και να αυξήσει τους κυτταροπροστατευτικούς παράγοντες. (Eells et al., 2004; Spiegel & Sadun, 2022) Η ροτενόνη λειτουργεί ως αναστολέας του συμπλέγματος I καταστρέφοντας τα γαγγλιακά κύτταρα, το NIR όμως μπορεί να αποτρέψει αυτή τη διαδικασία. (Rojas et al., 2008; Spiegel & Sadun, 2022; Zhu et al., 2021) Υπάρχουν κάποια διλήμματα όσον αφορά την θεραπευτική του εφαρμογή στη LHON, καθώς υπάρχει το ενδεχόμενο αυξάνοντας την διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης να αυξηθούν και οι δραστικές μορφές οξυγόνου. Είχε ξεκινήσει μία κλινική δοκιμή αφού είχε δοθεί έγκριση από τον FDA αλλά δεν κατάφερε να στρατολογήσει αρκετούς ασθενείς. (Spiegel & Sadun, 2022)

Σε κάποιες ασθένειες που επηρεάζουν τον αμφιβληστροειδή και το οπτικό νεύρο είχαν βρεθεί κάποια θετικά αποτελέσματα με τις τεχνικές ηλεκτρικής διέγερσης. Η εφαρμογή της έχει αξιολογηθεί στη τραυματική μη-αρτηριτιδικού τύπου οπτική νευροπάθεια καθώς και σε ασθένειες του αμφιβληστροειδή. (Sehic et al., 2016; Spiegel & Sadun, 2022) Υπάρχουν κάποιες μελέτες οι οποίες αφορούν την αποτελεσματικότητα

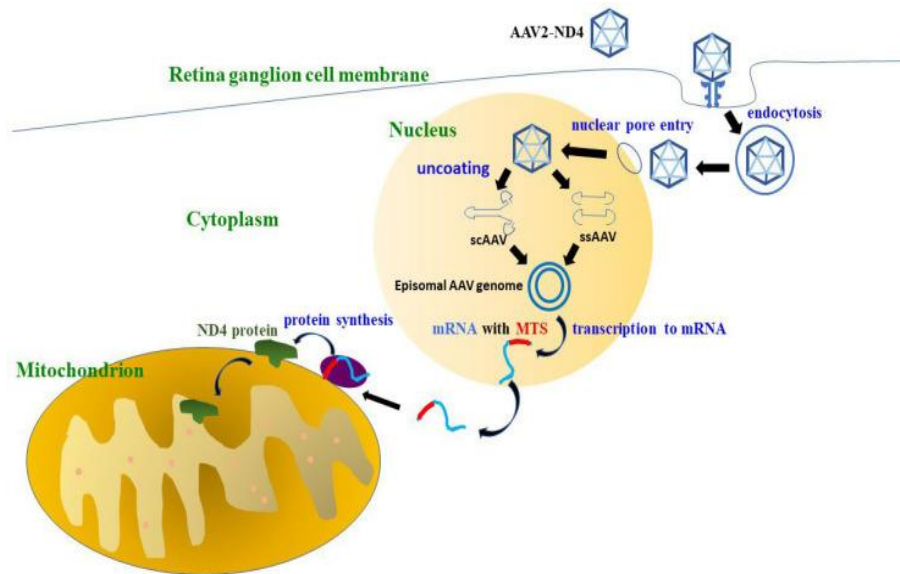
και την επίδοση της ηλεκτρικής διέγερσης σε ασθενείς με LHON χρόνιας φάσης. Τα αποτελέσματα είναι πολλά υποσχόμενα, ωστόσο υπάρχει έλλειψη τυχαιοποίησης και/ή ομάδας μαρτύρων, οπότε για να υπάρξουν κάποια πιο σαφή αποτελέσματα θα πρέπει να γίνει περαιτέρω έλεγχος. (Kurimoto et al., 2020; Perin et al., 2020; Spiegel & Sadun, 2022)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

3.1. Γονιδιακή θεραπεία με AAV2-ND4

Μεγάλη πρόοδος έχει σημειωθεί, τα τελευταία 10 χρόνια στην εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας σε μονογονιδιακές ασθένειες που προκαλούν τύφλωση. Η υπολειπόμενη μετάλλαξη του RPE65 που προκαλεί συγγενή αμαύρωση Leber, ήταν η πρώτη προσπάθεια που πήρε έγκριση και από τον Οργανισμό Φαρμάκων Αμερικής (FDA) και από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA) για την εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας. (Russell et al., 2017) Η χρήση της γονιδιακής θεραπείας σε ασθένειες που προκαλούνται από μιτοχονδριακές μεταλλάξεις είναι πιο απαιτητική λόγω των πολλαπλών αντιγράφων του mtDNA, καθώς και της δυσκολίας προσπέλασης της εξωτερικής και εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων για τη μεταφορά νουκλεϊκών οξέων στο στρώμα. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε η στρατηγική αλλοτοπικής έκφρασης. Με αυτήν την τεχνική το φυσιολογικό γονίδιο μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου, όπου εκφράζεται και στη συνέχεια μεταφράζεται στα ριβοσώματα. Η πρωτεΐνη φέρει μία μιτοχονδριακή αλληλουχία στόχο (MTS) η οποία είναι ικανή να την μεταφέρει στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου, όπως συμβαίνει και με τις ενδογενείς πρωτεΐνες του οργανισμού. (Cwerman-Thibault et al., 2015) «Ο rAAV2/2-ND4 (GS010) είναι ένας αδενοσχετιζόμενος ιός, ορότυπου 2, ο οποίος φέρει ένα τροποποιημένο συμπληρωματικό DNA (cDNA) που κωδικοποιεί τη φυσιολογική πρωτεΐνη ND4 και μία συγκεκριμένη MTS.» Σε προκλινικές μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα με τη μετάλλαξη m.11778G>A φάνηκε πως το rAAV2/2-ND4 έσωσε τη λειτουργία του συμπλέγματος I, το ίδιο έδειξε και μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε αρουραίο με LHON. (Cwerman-Thibault et al., 2015; Guy et al., 2002; R. Koilkonda et al., 2014; R. D. Koilkonda et al., 2010)



Εικόνα 5. Το μονοπάτι της μεταγωγής του AAV2-ND4. (Chi et al., 2022)

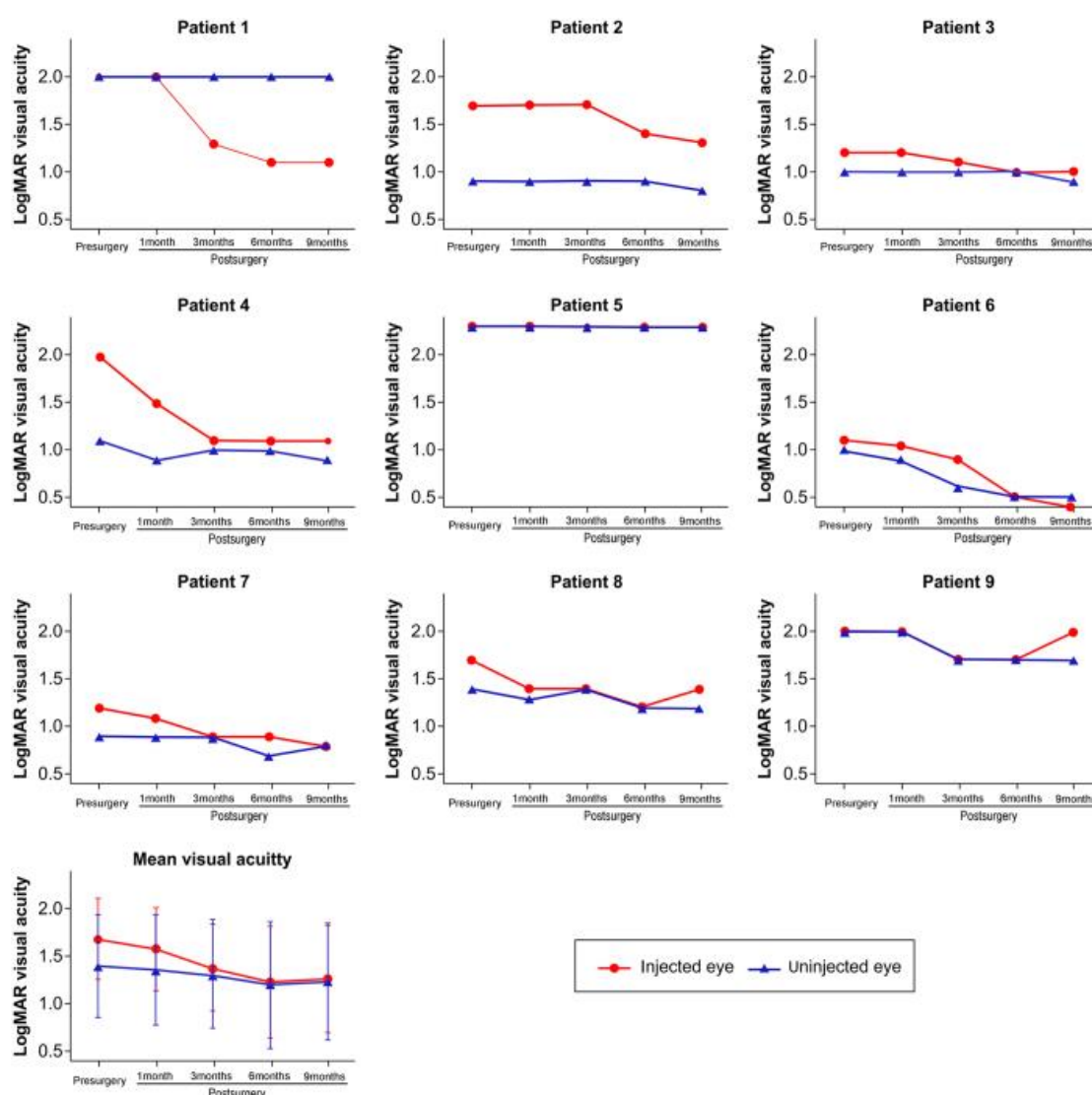
Στη συνέχεια αναλύονται οι προσπάθειες γονιδιακής θεραπείας που έχουν γίνει διαχρονικά στη LHON.

Στις μελέτες που αναλύονται ως αρχική μέτρηση (baseline) θα αναφέρεται η μέτρηση που έγινε πριν τη λήψη της θεραπείας.

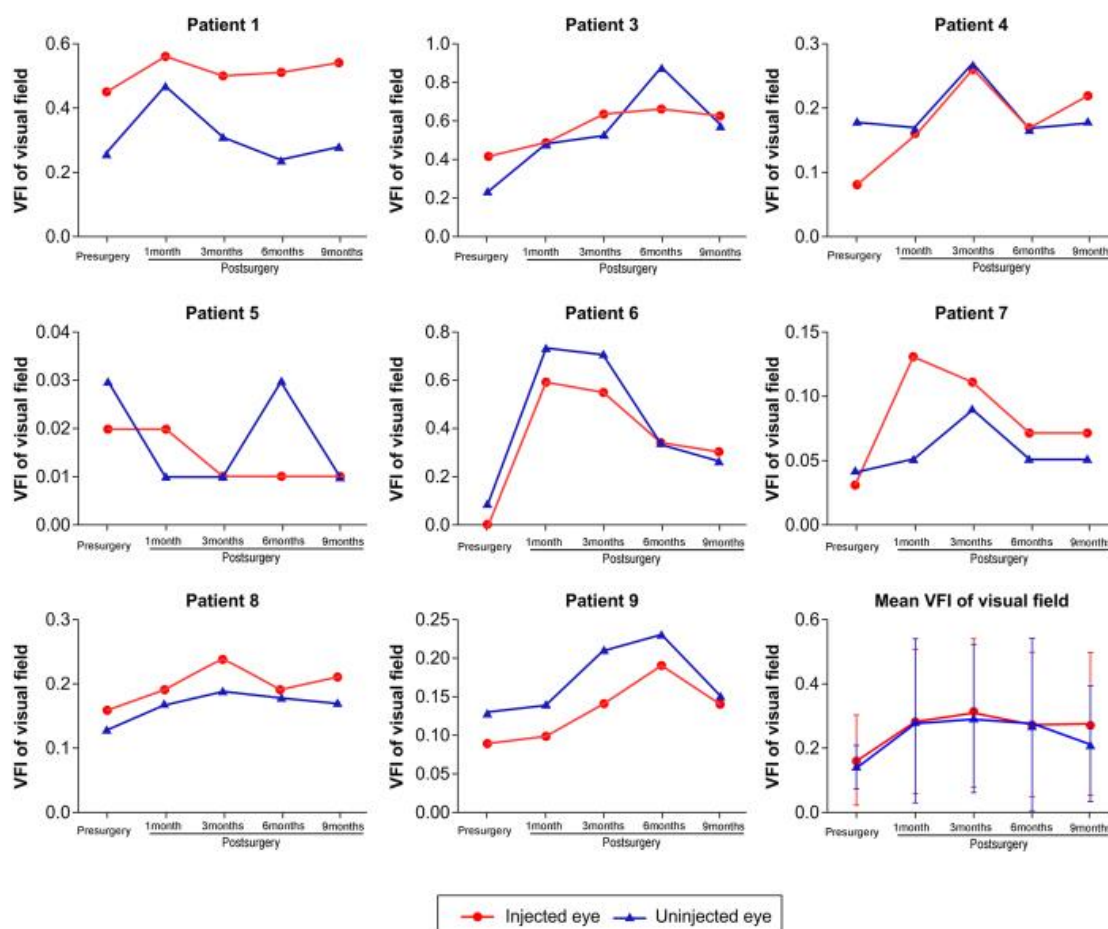
3.2 Κλινική δοκιμή φάσης I (NCT01267422)

Το 2011 οι Wan et al διεξήγαγαν μία μελέτη φάσης I στρατολογώντας 9 LHON ασθενείς με τη μετάλλαξη 11778G>A για την αξιολόγηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας μίας rAAV2-ND4 ενδοϋαλοειδικής ένεσης. Όλοι έλαβαν τη θεραπεία σε δοσολογία 5×10^9 vg/0.05ml για ασθενείς <12 ετών και 1×10^{10} vg/0.05ml για ασθενείς >12 ετών στον οφθαλμό με τη χειρότερη οπτική οξύτητα, ενώ ένας ασθενής έλαβε τη θεραπεία αμφοτερόπλευρα. Ο πρωταρχικός στόχος αυτής της μελέτης ήταν η ανάκτηση της οπτικής οξύτητας, μία αλλαγή του BCVA της τάξης του 0.3 logMAR ή περισσότερο θεωρούνταν σημαντική, ενώ οι επόμενοι στόχοι αφορούσαν μία αλλαγή στα ευρήματα του οπτικού πεδίου, του VEP και του OCT. 6 από τους ασθενείς που έλαβαν μέρος στη μελέτη είχαν βελτίωση της οπτικής τους οξύτητας στα μάτια που τους χορηγήθηκε η έγχυση με τουλάχιστον 0.3logMAR μετά από 9 μήνες. Δεν σημειώθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες σχετικές με την ενδοϋαλοειδική έγχυση ή άλλες επιπλοκές. 1 εβδομάδα πριν και 2 μήνες μετά την θεραπεία οι ασθενείς πήραν από του στόματος κορτικοστεροειδή για να αποφευχθούν

σοβαρές ανοσιακές απαντήσεις. Όπως έδειξαν τα αποτελέσματα η συστηματική απάντηση ήταν ήπια. Το OCT δεν έδειξε καμία σημαντική αλλαγή στη στιβάδα των νευρικών αξόνων του αμφιβληστροειδούς. 1 μήνα μετά την έγχυση 3 ασθενείς ανέφεραν βελτίωση στο οπτικό τους πεδίο (από αυτούς που είχαν βελτίωση στην οπτική οξύτητα). 8 ασθενείς είχαν αυξημένο VFI μετά τη θεραπεία. Το MD επίσης έδειξε κάποια βελτίωση στους 6 και 9 μήνες μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση. Τα αποτελέσματα του VEP είχαν αύξηση αλλά ήταν ασταθή. Τα ευρήματα της μελέτης δείχνουν πως μία ενδοϋαλοειδική έγχυση του rAAV2-ND4 είναι ασφαλής και αποτελεσματική. (Wan et al., 2016)



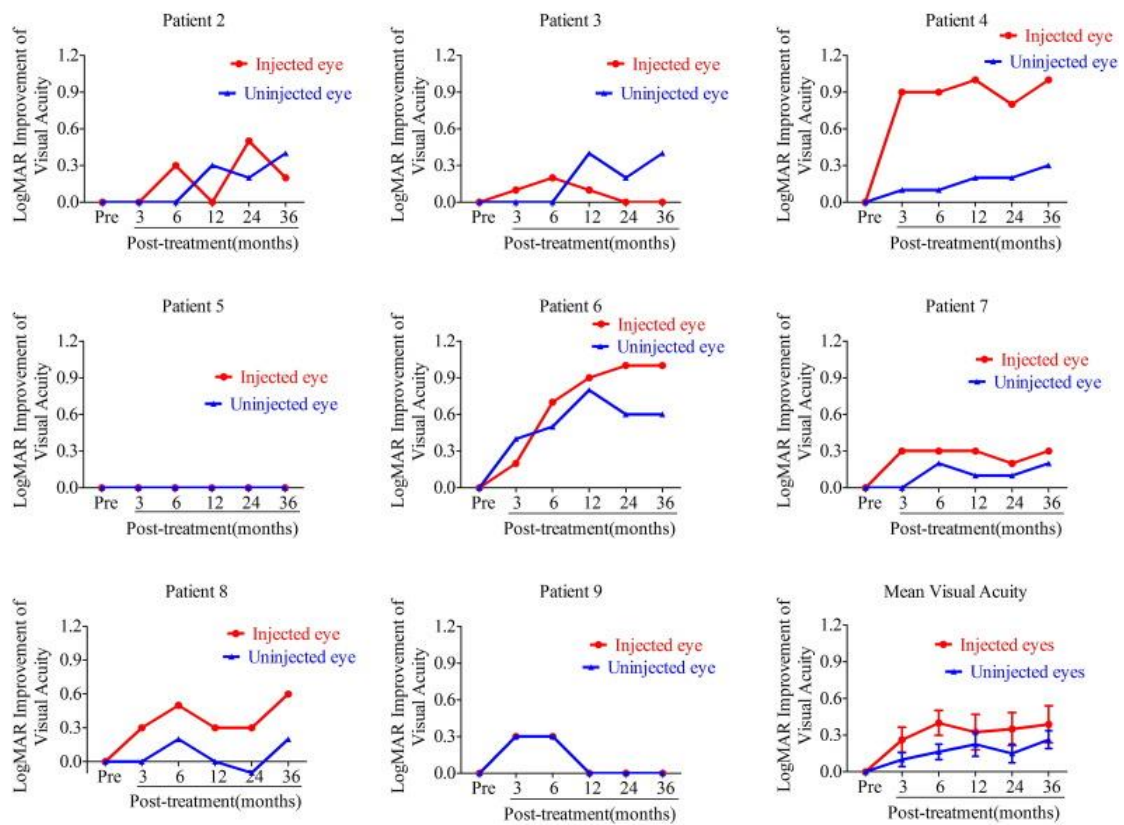
Διάγραμμα 1. Παρουσιάζονται διαγράμματα των 9 ασθενών για την οπτική οξύτητα πριν και μετά τη θεραπεία και της μέσης τιμής του BCVA των οφθαλμών που έλαβαν την ένεση και αυτών που δεν την έλαβαν πριν και 1,3,6, και 9 μήνες μετά την ένεση.(Wan et al., 2016)



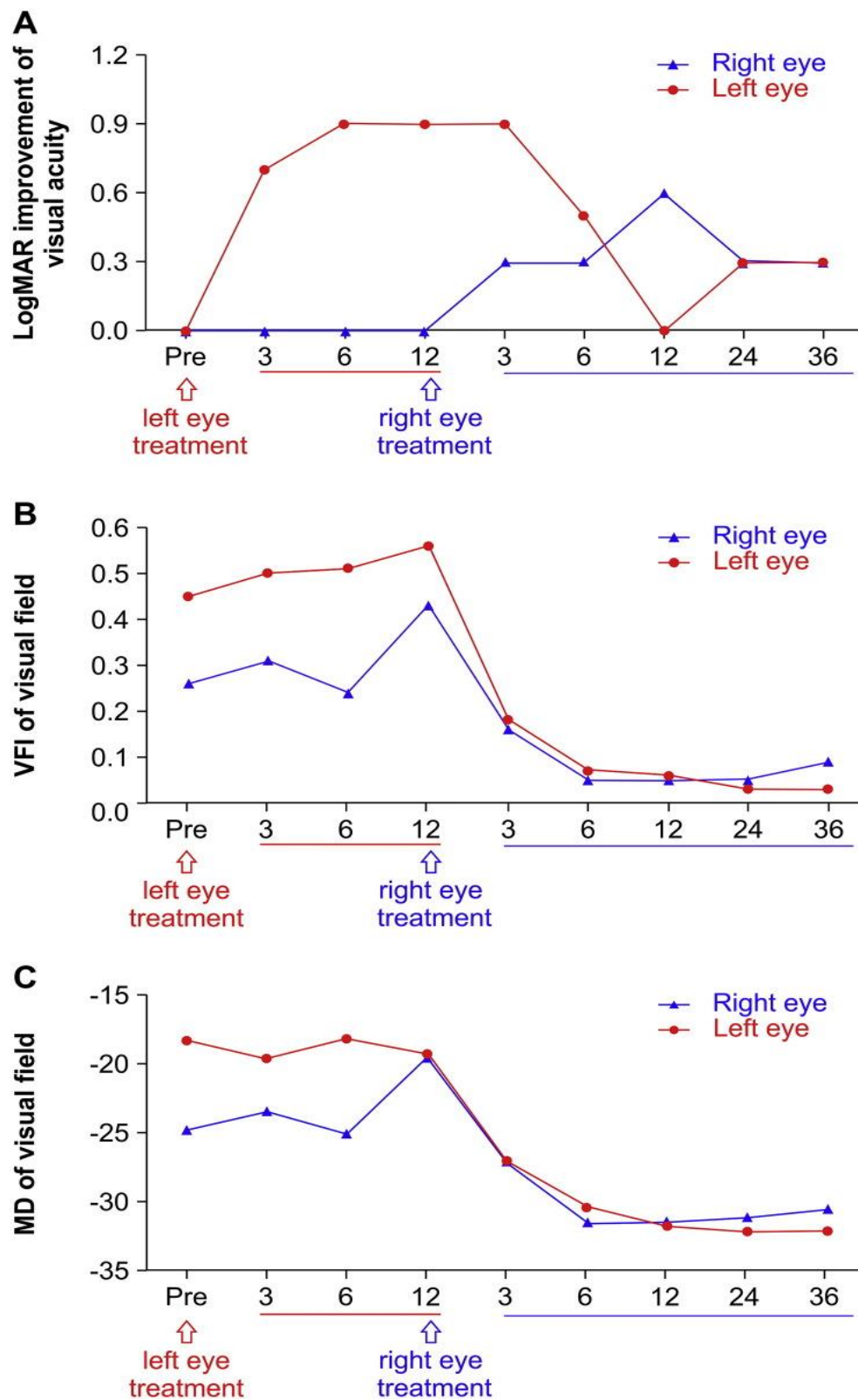
Διάγραμμα 2. VFI των οφθαλμών που έλαβαν και μη την ένεση των 9 ασθενών και η μέση τιμή του VFI των οφθαλμών που έλαβαν την ένεση και μη πριν και 1,3,6 και 9 μήνες μετά τη θεραπεία. 8 ασθενείς είχαν βελτίωση. (Wan et al., 2016)

Στη συνέχεια διεξήγαγαν μία ανάλυση υποομάδας ανάλογα με το χρονικό διάστημα που έπασχαν οι ασθενείς. Σε αυτή την ανάλυση δεν συμπεριλήφθηκε ο ασθενής 1, ο οποίος 12 μήνες μετά τη θεραπεία στο 1 μάτι έλαβε τη γονιδιακή θεραπεία και στο άλλο. Ο ασθενής αυτός είχε τη μεγαλύτερη βελτίωση στο αριστερό μάτι 6 μήνες μετά τη θεραπεία, ενώ 12 μήνες μετά τη πρώτη θεραπεία, πραγματοποιήθηκε ενδοϋαλοειδική έγχυση και στο δεξί μάτι. 3 μήνες αργότερα το BCVA του αριστερού οφθαλμού μειώθηκε κατά 0.6 και 12 μήνες αργότερα το BCVA άρχισε να μειώνεται και στο άλλο μάτι. Η οπτική οξύτητα σταθεροποιήθηκε στους 24 μήνες και στους 36 είχε μία βελτίωση 0.3 logMAR από την αρχική μέτρηση. Παρόμοιες αλλαγές είχαν και τα οπτικά πεδία, ωστόσο η πυκνότητα του RNFL έμεινε σταθερή. Όσον αφορά τα

οπτικά προκλητά δυναμικά 12 μήνες μετά τη θεραπεία στο ένα μάτι τα αποτελέσματα έδειχναν βελτίωση της λειτουργίας του οπτικού νεύρου, ωστόσο 36 μήνες μετά τη θεραπεία και στο δεύτερο μάτι υπήρξε πτώση στη λειτουργικότητα του οπτικού νεύρου. Τα αποτελέσματα των υπόλοιπων 8 ασθενών έδειξαν ότι εκείνοι που η νόσος διαρκούσε <2 χρόνια είχαν μέσο όρο βελτίωσης του BCVA, σε σχέση με την αρχική μέτρηση, 0,30logMAR στο θεραπευμένο μάτι και 0,35logMAR στο άλλο, ενώ σε αυτούς που είχαν ≥ 2 χρόνια διάρκειας η βελτίωση ήταν 0,40logMAR στο θεραπευμένο μάτι και 0,25logMAR στο μη θεραπευμένο. Οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν στους 36 μήνες μετά τη θεραπεία. Ανάμεσα σε αυτά τα δύο γκρουπ δεν υπήρξε σημαντική διαφορά. Επίσης, και ανάμεσα στους ασθενείς που είχαν βελτίωση του BCVA και σε αυτούς που δεν είχαν βελτίωση δεν υπήρξε διαφορά στο μέσο όρο ηλικίας έναρξης, διάρκειας της ασθένειας και του RNFL. Όσον αφορά τα οπτικά πεδία των ασθενών, παρουσίαζαν ταυτόχρονη βελτίωση με την οπτική οξύτητα. Το VFI και στα 2 μάτια βελτιώθηκε σε 5 (2,3,4,6 και 7) ασθενείς στους 36 μήνες σε σχέση με την αρχική μέτρηση. Σε αυτούς τους 8 ασθενείς στους 6 μήνες τα προκλητά οπτικά δυναμικά (VEP) έδειξαν μία βελτίωση της λειτουργικότητας του οπτικού νεύρου αλλά επέστρεψαν στις αρχικές τιμές μετά. Επίσης, και στα δύο γκρουπ οφθαλμών φάνηκε άνοδος του εύρους του P100 από την αρχική στους 36 μήνες, ωστόσο η διαφορά ανάμεσα στην αρχική και στους 36 μήνες μετά δεν ήταν σημαντική. Μέσω αυτών των αποτελεσμάτων φαίνεται πως υπάρχει περιορισμένη βελτίωση της λειτουργίας του οπτικού νεύρου και στα 2 μάτια, ιδιαίτερος ανάμεσα στους 6 με 12 μήνες μετά τη θεραπεία. Το OCT έμεινε το πιο σταθερό στα μάτια που έλαβαν τη θεραπεία, ωστόσο στα μάτια που δεν είχαν λάβει τη θεραπεία η πυκνότητα του RNFL σε όλο τον αμφιβληστροειδή και σε κάθε τεταρτημόριο ξεχωριστά ήταν χειρότερη στους 24 μήνες σε σχέση με την αρχική. Η επιδείνωση του ασθενή 1 μετά τη θεραπεία και στον δεύτερο οφθαλμό θα μπορούσε να αποτελεί ένα τυχαίο γεγονός ωστόσο υπάρχει και η σκέψη πως θα μπορούσε να συμβεί λόγω χυμικής ανοσίας έναντι του AAV2, που είχε χορηγηθεί 12 μήνες νωρίτερα στον πρώτο οφθαλμό. Οι απαραίτητες συστηματικές εξετάσεις είχαν δείξει φυσιολογική ανοσολογική απάντηση πριν την ενδοϋαλοειδική έγχυση στον δεύτερο οφθαλμό. Η παρακολούθηση των ασθενών για 36 μήνες έδειξε πως η γονιδιακή θεραπεία με rAAV2-ND4 είναι ασφαλής. Οι επιστήμονες, λόγω των αποτελεσμάτων του ασθενή 1, συνέστησαν προς το παρόν, να μην πραγματοποιείται αμφοτερόπλευρη ενδοϋαλοειδική έγχυση στη LHON. (Yang et al., 2016)

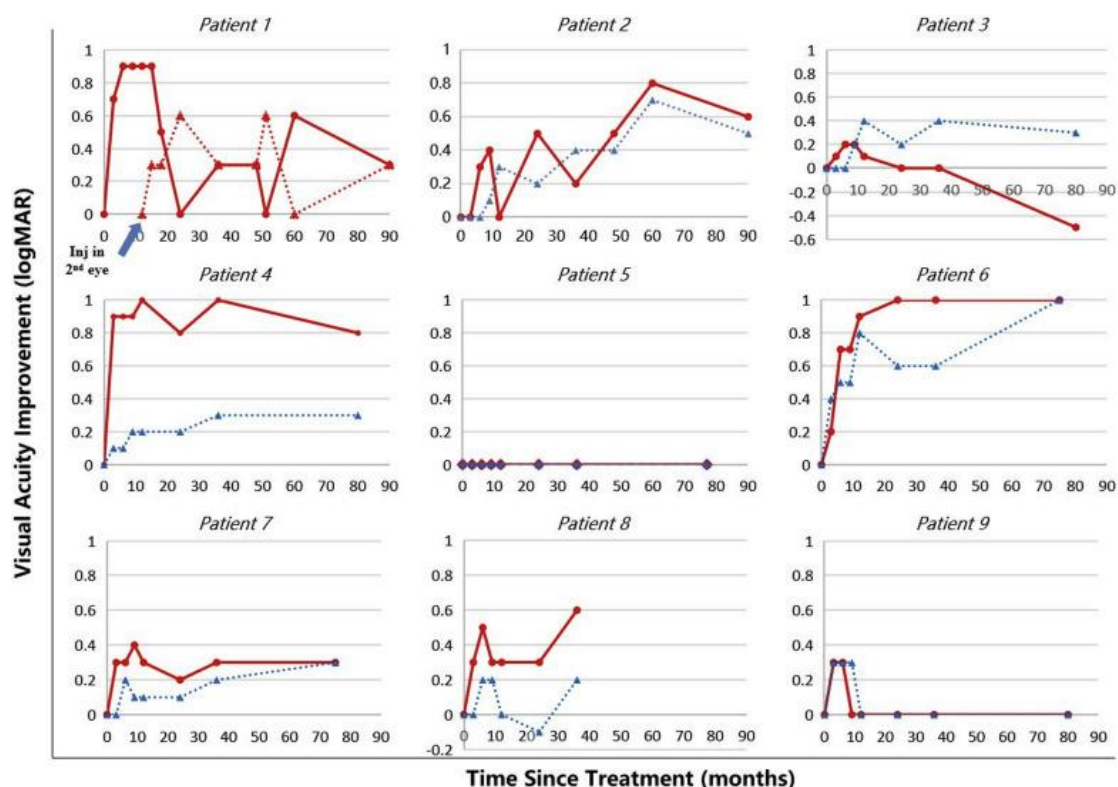


Διάγραμμα 3. Στα διαγράμματα αναπαριστώνται οι βελτιώσεις στην οπτική οξύτητα από την πριν την θεραπεία μέτρηση στα θεραπευμένα και μη μάτια και στους 3, 6, 12, 24, και 36 μήνες μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση του rAAV2-ND4.(Yang et al., 2016)



Διάγραμμα 4. Βελτίωση της οπτικής οξύτητας εκφρασμένης σε logMAR και των αλλαγών των παραμέτρων του οπτικού πεδίου σε έναν ασθενή που έλαβε τη γονιδιακή θεραπεία και στους 2 οφθαλμούς με 12 μήνες διαφορά. (Yang et al., 2016)

8 από τους 9 προαναφερθέντες ασθενείς παρακολούθηθηκαν για ένα διάστημα 75 έως 90 μήνες μετά τη θεραπεία. Μόνο ο ασθενής 8 δεν επέστρεψε για την περαιτέρω παρακολούθησή του. Ο πρωταρχικός στόχος ήταν η εκτίμηση της αλλαγής του BCVA και ο δεύτερος στόχος ήταν η αλλαγή των οπτικών πεδίων. 6 από τους 8 ασθενείς που συμμετείχαν στην παρακολούθηση διατήρησαν κλινικά σημαντική βελτίωση του BCVA. Κανείς δεν είχε ανεπιθύμητες ενέργειες.



Διάγραμμα 5. Στα διαγράμματα φαίνονται οι αλλαγές στο BCVA μετά από την ενδοϋαλοειδική έγχυση. Κόκκινη γραμμή: χορηγήθηκε γονιδιακή θεραπεία, Μπλε γραμμή: δεν χορηγήθηκε γονιδιακή θεραπεία. Ο ασθενής 1 έλαβε τη θεραπεία και στα 2 μάτια. Συμπαγής κόκκινη γραμμή: αριστερός οφθαλμός, γραμμή με κουκκίδες: δεξιός οφθαλμός. (Yuan et al., 2020)

Όσον αφορά τα οπτικά πεδία, οι ασθενείς 4 και 5 δεν είχαν σημαντικές αλλαγές από τις αρχικές μετρήσεις, ενώ οι 7 και 9 δεν είχαν καθόλου βελτίωση. Ο ασθενής 1 μετά τη θεραπεία στο πρώτο μάτι είχε μία βελτίωση, η οποία επιδεινώθηκε 1 χρόνο μετά τη θεραπεία στο άλλο μάτι. Ο ασθενής 2 παρουσίασε βελτίωση στο VFI και στο MD σχετικά με την αρχική εκτίμηση και τους 36 μήνες μετά. Ο ασθενής 3 είχε καλύτερη απόδοση στους 36 μήνες μετά, η οποία μειώθηκε στους 80 μήνες. Ενώ ο ασθενής 6

είχε χειρότερα αποτελέσματα στους 12 μήνες, τα οποία βελτιώθηκαν στους 24, 36 και 80 μήνες. Οι επιστήμονες συμπέραναν ότι καλύτερη ανάκτηση της οπτικής οξύτητας είχαν εκείνοι που λάμβαναν θεραπεία σε μικρότερη ηλικία και σε 1-2 χρόνια μετά την έναρξη της ασθένειας. Η γονιδιακή θεραπεία φάνηκε πως ήταν ασφαλής και καλά ανεκτή. (Yuan et al., 2020)

3.3. Κλινική δοκιμή φάσης I/II

Οι Vignal et al πραγματοποίησαν μία μονοκεντρική, ανοιχτή, κλινική δοκιμή φάσης I/II η οποία αποτελούνταν από 4 κοόρτες αυξανόμενης δόσης του rAAV2-ND4 (9×10^9 vg/οφθαλμός, 3×10^{10} vg/οφθαλμός, 9×10^{10} vg/οφθαλμός, 1.8×10^{11} vg/οφθαλμός) και μία κοόρτη επέκτασης (9×10^{10} vg/οφθαλμός). Συμμετείχαν 15 ασθενείς με LHON λόγω της μετάλλαξης 11778G>A, οι οποίοι έλαβαν μία ενδοϋαλοειδική έγχυση στον οφθαλμό με την χειρότερη οπτική οξύτητα. Η αρχική παρακολούθηση ήταν για 48 εβδομάδες αλλά υπήρξε και μία παρακολούθηση μακράς διάρκειας για ακόμη 4 χρόνια. Η εκτίμηση της ασφάλειας και της ανεκτικότητας των αυξανόμενων δόσεων ήταν τα πρώτα αποτελέσματα που έπρεπε να εκτιμηθούν. Στη συνέχεια η βιοδιασπορά, η ανοσογονικότητα και η εκτίμηση των οπτικών λειτουργιών έλαβαν χώρα. 96 ανεπιθύμητες ενέργειες αναφέρθηκαν την 96^η εβδομάδα, από τις οποίες οι 56 ήταν οφθαλμικές και οι 40 συστηματικές. Όλοι οι ασθενείς εμφάνισαν ανεπιθύμητες ενέργειες. Καμία ανεπιθύμητη ενέργεια σχετική με τη θεραπεία ή τη διαδικασία δεν ήταν σοβαρή και καμία δεν ήταν αναπάντεχη. Οι 2 πιο συχνές οφθαλμικές ανεπιθύμητες ενέργειες ήταν η αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης (ΕΟΠ) και η ενδοφθάλμια φλεγμονή, οι οποίες ήταν ήπιες εκτός από 2 σοβαρές που συνέβησαν στον ίδιο άνθρωπο. Τοπικά μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη χρησιμοποιήθηκαν για τη θεραπεία των περισσότερων, εκτός από 2 που δόθηκαν από του στόματος στεροειδή. Η αύξηση της ΕΟΠ την ημέρα της θεραπείας αποφασίστηκε ότι σχετιζόταν με τη διαδικασία, ενώ η καθυστερημένη αύξηση θεωρούνταν σχετική με τη θεραπεία. Όλες οι ανεπιθύμητες ενέργειες θεραπεύτηκαν είτε με τη χρήση αντιφλεγμονωδών είτε με τη θεραπεία με παράγοντες που μειώνουν την ΕΟΠ, είτε είχαν αυτόματη υποστροφή, εκτός από μία περίπτωση στην οποία ο ασθενής εμφάνισε ήπια υαλίτιδα αλλά ο ίδιος δεν συνέχισε τη μελέτη κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης. Μία κλινικά σημαντική βελτίωση του BCVA σε 6 από τα 14 άτομα σημειώθηκε την εβδομάδα 96, ομοίως και την εβδομάδα 78 και τη 48. Επίσης, την

εβδομάδα 96 παρατηρήθηκε μία διαφορά ανάμεσα στα 2 μάτια όσον αφορά την αλλαγή της οπτικής οξύτητας από την αρχική μέτρηση, σε ένα υποσύνολο ασθενών με εμφάνιση της ασθένειας ≤ 2 έτη και BCVA $\geq 20/12000$ (αρχική μέτρηση), διαφορές παρατηρήθηκαν και την εβδομάδα 48 και την 78. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως 2 χρόνια μετά η γονιδιακή θεραπεία είναι ασφαλής και καλά ανεκτή.(Vignal et al., 2018)

Στη συνέχεια διεξήχθη μία περαιτέρω ανάλυση αυτής της κλινικής δοκιμής για να εξετάσει την συσχέτιση ανάμεσα στην ανοσολογική απάντηση και την ενδοφθάλμια φλεγμονή μετά τη χορήγηση της γονιδιακής θεραπείας. Τα δεδομένα ελήφθησαν από τα πρώτα 2 χρόνια μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση. Η αξιολόγηση έγινε με τη χρήση του σκορ οφθαλμικής φλεγμονής (OIS) και με την εκτίμηση της ανοσολογικής απόκρισης.

Από τους 15 ασθενείς οι 13 εμφάνισαν ενδοφθάλμια φλεγμονή. 10 ασθενείς είχαν φλεγμονή προσθίου θαλάμου, από όλες τις δόσεις εκτός από την 9×10^9 vg/eye, ωστόσο δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση ανάμεσα στην δοσολογία και στην ένταση της φλεγμονής. Χορηγήθηκε τοπική αντιφλεγμονώδης θεραπεία η οποία ήταν αποτελεσματική σε όλους τους ασθενείς. Μόνο 2 από τις περιπτώσεις θεωρήθηκαν ότι δεν σχετίζονται με την ενδοϋαλοειδική έγχυση καθώς συνέβησαν στον οφθαλμό που δεν έλαβε τη θεραπεία και σε ασθενή με ιστορικό ιδιοπαθούς ραγοειδίτιδας. Οι υπόλοιπες καταγράφηκαν ως πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες της θεραπείας.

Η ενδιάμεση ραγοειδίτιδα (υαλίτιδα) που προέκυψε στους ασθενείς, ανευρέθηκε σε όλες τις δόσεις και θεωρήθηκε πως πιθανόν συνδέεται με την θεραπεία. Προέκυψαν 13 περιπτώσεις υαλίτιδας, στις 8 χορηγήθηκαν τοπικά αντιφλεγμονώδη και σε 3 από αυτές (σε 2 ασθενείς) δόθηκαν και από του στόματος κορτικοστεροειδή. Καμία δεν είχε κάποιο επακόλουθο. Σε 4 περιπτώσεις δεν χρειάστηκε θεραπεία και 1 ασθενής ανακάλεσε την γραπτή συναίνεση.

Ένας από τους λήπτες της δόση 9×10^{10} vg/eye είχε σοβαρή φλεγμονή στον πρόσθιο θάλαμο και υαλίτιδα 13 ημέρες μετά την θεραπεία ενώ οι υπόλοιπες φλεγμονές ήταν ήπιες.

Η Post Hoc Ανάλυση του Σκορ Οφθαλμικής Φλεγμονής (OIS) έδειξε τα παρακάτω αποτελέσματα. Στην αρχική επίσκεψη το σκορ ήταν μηδενικό , ενώ για όλες τις

δόσεις ο μέσος όρος κορυφώθηκε στο 1.1 στις 4 εβδομάδες. Τα υψηλότερα σκορ που σημειώθηκαν ήταν το 5 σε έναν ασθενή που έλαβε τη δόση 9×10^{10} και το 9.5 σε άλλον έναν που έλαβε την ίδια δόση. Μέχρι την εβδομάδα 78 το αργότερο, όλα τα σκορ είχαν επιστρέψει στο αρχικό. Από ότι φάνηκε από την ανάλυση, το OIS δεν αντιστοιχούσε σταθερά στην ένταση των οφθαλμικών φλεγμονών.

Η κυτταρική ανοσολογική απόκριση φάνηκε πως δεν σχετίζεται με τη δοσολογία του ιού. Επίσης, ένας ασθενής ο οποίος δεν εμφάνισε οφθαλμική φλεγμονή η κυτταρική του ανοσία αυξήθηκε 12 φορές από την αρχική, σε έναν άλλο ασθενή αυξήθηκε 6 φορές, σποραδική αύξηση παρατηρήθηκε σε 1 ασθενή. Οι υπόλοιποι δεν εμφάνισαν εμφανή κυτταρική ανοσολογική απόκριση.

Το επίπεδο των anti-AAV2 IgG αντισωμάτων είχε μεγάλη ποικιλία στις αρχικές μετρήσεις. Θετικά αποτελέσματα είχαν 9 από τους 15 ασθενείς και η κορύφωσή τους συνέβη από τις 12 έως τις 24 εβδομάδες. Όλα τα αντισώματα IgG μειώθηκαν στη συνέχεια. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ο ασθενής που εμφάνισε σοβαρή ραγοειδίτιδα (δόση 9×10^{10} vg/eye) είχε υψηλά επίπεδα anti-AAV2 IgG στην αρχική μέτρηση.

Σε 6 ασθενείς υπήρξε αύξηση των εξουδετερωτικών αντισωμάτων (Nab), η οποία επέστρεψε στα αρχικά επίπεδα στην εβδομάδα 36. Δεν φάνηκε να υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην απάντηση των Nab και του αρχικού τους επιπέδου ή της δόσης της γονιδιακής θεραπείας που τους χορηγήθηκε. Πριν την έγχυση είχε γίνει λήψη υδατοειδούς υγρού για την ανεύρεση των εξουδετερωτικών αντισωμάτων σε 8 ασθενείς, ωστόσο τα δείγματα των ασθενών ήταν όλα αρνητικά.

Αρχικά υπήρχε η υποψία ότι το επίπεδο των εξουδετερωτικών αντισωμάτων (Nab) στην αρχική μέτρηση μπορεί να σχετίζεται με την φλεγμονή στους οφθαλμούς, ωστόσο δεν υπήρξε καμία συσχέτιση μεταξύ τους. Όπως επίσης δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση ανάμεσα στο OIS και στο επίπεδο των Nab σε κανένα σημείο της περιόδου που αναλύθηκε. Δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση ανάμεσα στην οφθαλμική φλεγμονή και στην ανοσιακή απάντηση είτε είναι κυτταρική είτε είναι χυμική.

Σε γενικές γραμμές, τα συμπεράσματα της συγκεκριμένης κλινικής μελέτης έδειξαν πως η χορήγηση γονιδιακής θεραπείας με rAAV2/2-ND4 είναι ασφαλής, καθώς επίσης έχει καλή ανεκτικότητα με συνήθως ήπιες ενδοφθάλμιες φλεγμονές που αντιμετωπίζονται με την κατάλληλη αγωγή και ενδεχομένως δύναται να αποφευχθούν με τη χρήση προφυλακτικής ανοσοκατασταλτικής θεραπείας. (Bouquet et al., 2019)

3.4. Κλινική δοκιμή φάσης I (NCT02161380)

Τον Ιούλιο του 2014 ξεκίνησε μία μελέτη φάσης I η οποία εκτιμάται ότι θα ολοκληρωθεί το 2025 με αριθμός ταυτοποίησης (NCT02161380). Η μελέτη αυτή στρατολόγησε 28 ασθενείς, τους οποίους χώρισε σε 3 ομάδες: την χρόνια αμφοτερόπλευρη, την οξεία αμφοτερόπλευρη και την οξεία μονόπλευρη. Θα χορηγηθούν 4 διαφορετικές δόσεις του scAAV2-P1ND4v2: η χαμηλή (1.18×10^9), η μεσαία (5.81×10^9), η υψηλή (2.4×10^{10}) και η υψηλότερη (1.0×10^{11}). Σκοπός της έρευνας είναι να αξιολογηθεί η τοξικότητα της θεραπείας και η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητά της σε χρονική περίοδο 3 χρόνων. Αυτή τη στιγμή η μελέτη είναι ενεργή αλλά δεν στρατολογεί κόσμο. (*Safety Study of an Adeno-Associated Virus Vector for Gene Therapy of Leber's Hereditary Optic Neuropathy - Full Text View - ClinicalTrials.Gov, n.d.*)

Τα πρώτα αποτελέσματα της έρευνας παρουσιάζονται παρακάτω. Η μελέτη αυτή είχε ως στόχο την εκτίμηση της ασφάλειας 3 δόσεων (5×10^9 vg, 2.46×10^{10} vg, και 1×10^{11} vg) του scAAV2-P1ND4v2. Δημιουργήθηκαν 3 ομάδες. Η ομάδα 1 ήταν το αμφοτερόπλευρο χρόνιο γκρουπ, στο οποίο συμμετείχαν ασθενείς με απώλεια όρασης ≥ 12 μήνες σε 1 μάτι και τουλάχιστον 6 στο άλλο. Και οι δύο οφθαλμοί έπρεπε να έχουν οπτική οξύτητα ≤ 35 γράμματα (Snellen=20/200). Η ομάδα 2 ήταν το αμφοτερόπλευρο οξύ γκρουπ, το οποίο αποτελούνταν από ασθενείς με αμφοτερόπλευρη απώλεια όρασης < 12 μήνες και οπτική οξύτητα < 35 ETDRS γράμματα. Η ομάδα 3 ήταν το μονόπλευρο οξύ γκρουπ, η οποία είχε ασθενείς με οπτική οξύτητα < 35 ETDRS γράμματα και απώλεια όρασης < 12 μήνες στον έναν οφθαλμό, ο έτερος οφθαλμός έπρεπε να έχει οπτική οξύτητα ≥ 70 γράμματα (Snellen=20/40), σε αυτή την ομάδα ο καλύτερος οφθαλμός έλαβε τη θεραπεία. Μία μονόπλευρη ενδοϋαλοειδική έγχυση του scAAV2-P1ND4v2 ελήφθη από κάθε ασθενή. 4 ασθενείς ήταν στην ομάδα 1 και 1 στην ομάδα 2. Τη χαμηλή δόση (5×10^9 vg) έλαβαν οι 3 πρώτοι ασθενείς καθώς και ο 5ος από την ομάδα 2, ενώ ο 4^{ος} της ομάδας 1 έλαβε την μεσαία δόση (2.46×10^{10} vg). Μόνο 2 ασθενείς είχαν σημαντική βελτίωση στην οπτική οξύτητα στις 90 ημέρες μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση, ο 4^{ος} στον οποίο χορηγήθηκε η μεσαία δόση και ο 5^{ος} στον οποίο χορηγήθηκε η χαμηλή δόση. Οι υπόλοιποι δεν είχαν καμία βελτίωση. Ο 4^{ος} ασθενής στην αρχική μέτρηση είχε αντίληψη κινούμενης χειρός αμφοτερόπλευρα αλλά στην αξιολόγηση των 3 μηνών μπορούσε να διαβάσει 7 γράμματα στο θεραπευμένο μάτι

και 9 στο άλλο. Ο 5^{ος} ασθενής στην αρχική μέτρηση αντιλαμβανόταν μέχρι 15 γράμματα αλλά στην αξιολόγηση των 3 μηνών μπορούσε να διαβάσει μέχρι 30 γράμματα στο θεραπευμένο μάτι και 22 (από 20 στην αρχική μέτρηση) στο άλλο. Η μέτρηση της πυκνότητας του RNFL με τη διενέργεια OCT, καθώς και το εύρος του PERG δεν έδειξαν καμία αλλαγή σε κανέναν από τους ασθενείς. Σε όλους ήταν ανιχνεύσιμα τα εξουδετερωτικά αντισώματα (Nab) πριν την ένεση αλλά μόνο σε έναν παρατηρήθηκε παροδική αύξηση αυτών στον ορό μετά την έγχυση. Στον πρόσθιο θάλαμο η ποσότητα των Nab ήταν μικρότερη σε σχέση με αυτά του ορού και σε κανέναν ασθενή δεν ανιχνεύτηκε DNA του ιού στο αίμα είτε πριν είτε μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση. Δεν παρατηρήθηκαν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες είτε οφθαλμικές είτε συστηματικές σε κανέναν. Οι βελτιώσεις της οπτικής οξύτητας που παρατηρήθηκαν ήταν μέσα στο εύρος της αυτόματης ανάκτησης στους ασθενείς με φυσική εξέλιξη και μετάλλαξη στο γονίδιο G11778A, ωστόσο παρατηρήθηκαν μετά τη θεραπεία και όχι κατά τη διάρκεια των εξετάσεων πριν την θεραπεία. Είναι σημαντικό επίσης να τονιστεί ότι κανένας ασθενής δεν έχασε την όρασή του ενώ στην μελέτη φυσικής εξέλιξης που διεξήγαγε η συγκεκριμένη ομάδα, το 14% των ασθενών είχαν επιδείνωση της όρασης, ωστόσο τα κριτήρια καταλληλότητας ανάμεσα στις 2 μελέτες διέφεραν. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως δεν υπήρξαν σοβαρά θέματα ασφαλείας. (Feuer et al., 2016)

Στη μελέτη αυτή στη συνέχεια στρατολογήθηκαν 9 ακόμα άτομα. Ο συνολικός αριθμός των συμμετεχόντων πλέον ανερχόταν στους 14. 6 ασθενείς αποτελούσαν την ομάδα 1, οι 3 πρώτοι έλαβαν την χαμηλή δόση (5×10^9 vg) οι άλλοι 3 τη μεσαία (2.46×10^{10} vg). 6 ασθενείς την ομάδα 2, στους 3 πρώτους επίσης χορηγήθηκε η χαμηλή δόση και στους υπόλοιπους η μεσαία. 2 ασθενείς την ομάδα 3, έλαβαν την χαμηλή δόση στον καλύτερο οφθαλμό. Σε σύγκριση με την αρχική οπτική οξύτητα στο αμφοτερόπλευρο χρόνιο γκρουπ και στο αμφοτερόπλευρο οξύ γκρουπ υπήρξε μία βελτίωση της τάξης του 0,24 logMAR στο μάτι που έλαβε τη θεραπεία και 0,09 logMAR στο μάτι που δεν έλαβε τη θεραπεία στους 12 μήνες μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση. Σε μια post hoc ανάλυση που έγινε, στην οποία συγκρίθηκε η αλλαγή ανάμεσα στα θεραπευμένα μάτια και στα μη θεραπευμένα από το γκρουπ 2 στους 12 μήνες η βελτίωση ήταν 0.53logMAR και ήταν μεγαλύτερη από το 0.21logMAR που παρατηρήθηκε στους ασθενείς οξείας φάσης στη μελέτη φυσικής εξέλιξης που είχαν πραγματοποιήσει πρωτότερα. Τα αποτελέσματα, στους 18 μήνες

ήταν 0.96logMAR για το γκρουπ 2 ενώ για τους ασθενείς οξείας φάσης στη μελέτη φυσικής εξέλιξης της LHON ήταν 0.17logMAR. Δεν σημειώθηκε καμία βελτίωση στο γκρουπ 3. Το κροταφικό RNFL παρέμεινε σε σταθερά επίπεδα. Επίσης, στα θεραπευμένα μάτια το εύρος του PERG χειροτέρευσε περισσότερο από ότι στα άλλα μάτια και δεν σημειώθηκε καμία αλλαγή ανάμεσα στους οφθαλμούς στις υπόλοιπες οπτικές λειτουργίες. Από το γκρουπ 1 υπήρξε βελτίωση σε 1 από τους 6 ασθενείς, από το γκρουπ 2, 3 στους 6 και από το γκρουπ 3 υπήρξε απώλεια όρασης σε 1 από τους 2 ασθενείς, το οποίο είναι συμβατό με την φυσική εξέλιξη της LHON και δεν αποφεύχθηκε με τη χρήση της χαμηλής δόσης. Η καλύτερη χρονική περίοδος για να δοθεί η θεραπεία φάνηκε πως ήταν μέσα σε 1 χρόνο από την έναρξη της απώλειας της όρασης. Η αλλοτοπική έκφραση του γονιδίου δεν φάνηκε να δημιουργεί σοβαρά θέματα ασφαλείας. Η πρωταρχική ανεπιθύμητη ενέργεια που συνδέθηκε με το φάρμακο ήταν η πρόσθια ραγοειδίτιδα, η οποία ήταν ήπια. Ενώ, σχετική με τη διαδικασία ήταν η αύξηση της ΕΟΠ και η τοξική κερατίτιδα σε έναν ασθενή. Επίσης, σημειώθηκε πως υψηλά επίπεδα Nab στον ορό μάλλον δεν παρεμποδίζουν την επιτυχία της θεραπείας. Το συμπέρασμα των επιστημόνων ήταν πως η χορήγηση της χαμηλής και της μεσαίας δόσης με αλλοτοπική έκφραση του γονιδίου ήταν ασφαλής και δεν κατέστρεψε το κροταφικό RNFL, κάτι το οποίο μπορεί να οδηγήσει στην αξιολόγηση της ασφάλειας της υψηλής δόσης. (Guy et al., 2017)

Στη συνέχεια αναφέρονται τα αποτελέσματα από τους 28 ασθενείς που έλαβαν και τις 4 δόσεις που αναφέρθηκαν προηγουμένως. 11 ασθενείς βρίσκονταν στο γκρουπ 1, 9 ασθενείς στο γκρουπ 2 και 8 ασθενείς στο γκρουπ 3. Έγινε έγχυση με τη χαμηλή, τη μεσαία, την υψηλή και την υψηλότερη δόση. Πραγματοποιήθηκε εκτίμηση του BCVA, των ανεπιθύμητων ενεργειών, και της δημιουργίας αντισωμάτων έναντι του ιού. Η μέση τιμή της περιόδου παρακολούθησης ήταν 24 μήνες. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως 8 από τους 28 ασθενείς εμφάνισαν ραγοειδίτιδα, η οποία συσχετίστηκε με τη δοσολογία καθώς συνέβη σε 5 από τους 7 που πήραν την υψηλότερη δόση και μόνο 3 από τους 21 που έλαβαν τις χαμηλότερες δόσεις. Η ραγοειδίτιδα που χρειάστηκε θεραπεία συσχετίστηκε με αυξημένα εξουδετερωτικά αντισώματα ορού. Από το γκρουπ 1 και 2 υπήρξε αύξηση ≥ 15 γράμματα και στους οφθαλμούς που έλαβαν τη θεραπεία αλλά και στους άλλους, καθώς επίσης διαπιστώθηκε βελτίωση και στους οφθαλμούς της φυσικής εξέλιξης (από ήδη δημοσιευμένη έρευνα), η οποία

χρησιμοποιήθηκε ως μέσο σύγκρισης του BCVA. Από το γκρουπ 3 όλοι οι οφθαλμοί υπό διερεύνηση έχασαν ≥ 15 γράμματα μέσα στον πρώτο χρόνο παρά το γεγονός ότι έλαβαν τη θεραπεία. Η μελέτη αυτή καταλήγει στο συμπέρασμα πως η θεραπεία αυτή είναι ασφαλής αλλά ότι αν υπάρχει κάποια αποτελεσματικότητα, είναι πιθανόν μικρή και είναι ανεξάρτητη από τη δοσολογία. Και καταλήγει στο γεγονός ότι η απόδειξη της αποτελεσματικότητας πρέπει να γίνει με την τυχαιοποίηση ασθενών μαρτύρων που δεν θα λάβουν καθόλου θεραπεία. (Lam et al., 2022)

3.5. Κλινική δοκιμή φάσης I/IIa (REVEAL)

Η Reveal είναι μία μονοκεντρική, ανοιχτή, φάσης I/IIa, κλινική δοκιμή αυξανόμενης δόσης. Συμμετείχαν 15 ασθενείς με LHON λόγω της μετάλλαξης 11778G>A στο γονίδιο ND4. Οι συμμετέχοντες χωρίστηκαν σε 5 ομάδες των 3 ατόμων. Στα 4 πρώτες ομάδες οι δόσεις αυξάνονταν διαδοχικά (9×10^9 (κοόρτη 1) , 3×10^{10} (κοόρτη 2) , 9×10^{10} (κοόρτη 3), και 1.8×10^{11} (κοόρτη 4) vg/eye) , η 5η ήταν μία κοόρτη επέκτασης στην οποία επιλέχθηκε μία δόση από τις προαναφερθείσες για περαιτέρω έλεγχο. Ο στόχος της μελέτης ήταν να εγκαθιδρυθεί η ανεκτικότητα και η ασφάλεια της rAAV2/2-ND4 ενδοϋαλοειδικής έγχυσης και να εκτιμηθεί η καλύτερη δόση που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στις μελέτες φάσης III.

Κριτήρια ένταξης:

Ηλικία ≥ 18 , διάγνωση της LHON με επιβεβαιωμένη μετάλλαξη στο γονίδιο ND4 11778G>A, η οπτική οξύτητα του χειρότερου οφθαλμού για τις κοόρτες 1-4 έπρεπε να είναι $\leq 20/200$ και για την 5 $\leq 20/63$ και να είναι σταθερή εδώ και 3 μήνες, το RNFL έπρεπε να είναι $\leq 80 \mu\text{m}$ (το οποίο αντιστοιχεί σε ασθένεια μακράς διάρκειας) αλλά να έχει επαρκή αριθμό γαγγλιακών κυττάρων, οι άρρενες έπρεπε να χρησιμοποιούν προφυλάξεις κατά τη σεξουαλική επαφή για 6 μήνες μετά τη θεραπεία και οι γυναίκες να έχουν αρνητικό τεστ εγκυμοσύνης και να συμφωνήσουν πως θα χρησιμοποιούν κάποια μέθοδο αντισύλληψης για τους επόμενους 18 μήνες.

Κριτήρια αποκλεισμού:

Απώλεια όρασης στον έτερο οφθαλμό, διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, γλαύκωμα, υαλοειδοαμφιβληστροειδική ασθένεια, οίδημα στην ωχρά κηλίδα, απόφραξη αμφιβληστροειδικής φλέβας, κάποια παθολογία στο οπτικό νεύρο ή στον αμφιβληστροειδή, στενή γωνία προσθίου θαλάμου, οπτική νευροπάθεια άλλης αιτιολογίας ή οποιαδήποτε άλλη ασθένεια μπορεί να μειώσει την οπτική οξύτητα, άλλη γνωστή μετάλλαξη που δημιουργεί κάποια παθολογία στον αμφιβληστροειδή, η

χρήση ιδεβενόνης θα έπρεπε να έχει διακοπεί από 7ημέρου και να μην έχει γίνει χρήση από του στόματος κορτικοστεροειδών τις τελευταίες 14 ημέρες. Επίσης, αποκλείονταν ασθενείς με HIV, σοβαρές διαταραχές στην πήξη του αίματος, αναιμία, αλλεργία ή υπερευαισθησία σε κάποιο από τα συστατικά που θα χρησιμοποιούνταν, σοβαρές συστηματικές νόσους ή σοβαρές διαταραχές στον εργαστηριακό έλεγχο. Απαγορευόταν χειρουργείο στον οφθαλμό καθώς και η συμμετοχή σε άλλη κλινική δοκιμή τους τελευταίους 3 μήνες. Οποιαδήποτε άλλη κατάσταση θεωρούσε ο ερευνητής ότι μπορεί να απειλήσει την ομαλή διεξαγωγή της έρευνας αποτελούσε κριτήριο αποκλεισμού.

Η συνολική επίπτωση ανεπιθύμητων ενεργειών για κάθε δόση αλλά και για όλη τη μελέτη μέχρι και 5 χρόνια μετά τη θεραπεία αποτέλεσε το πρωταρχικό ερώτημα. Ομοίως, καταγράφονταν και οι σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες. Άλλα αποτελέσματα που αξιολογήθηκαν ήταν η αποτελεσματικότητα (BCVA) , η ασφάλεια (κυτταρική και χυμική ανοσιακή απάντηση), η ευαισθησία αντίθεσης, η χρωματική αντίληψη, η εξέταση περιμετρίας, το ηλεκτροαμφιβληστροειδογράφημα προκαλούμενο από οπτικό ερέθισμα (pattern ERG), τα οπτικά προκλητά δυναμικά προκαλούμενα από διάχυτο φως (flash VEPs) και από εναλλασσόμενο μοτίβο (pattern reversal VEPs).

Από τα 15 άτομα που συμμετείχαν στην κλινική δοκιμή οι 13 ήταν άντρες και οι 2 γυναίκες, η μέση τιμή έναρξης απώλειας της όρασης μέχρι την θεραπεία ήταν 5.9 ± 7.3 χρόνια (mean±standard deviation) και ο μέσος όρος των ηλικιών που συμμετείχαν ήταν 47.9 ± 17.2 έτη. 12 από τους 15 ασθενείς ολοκλήρωσαν την 5ετή παρακολούθηση.

Μία ενδοϋαλοειδική έγχυση πραγματοποιήθηκε σε έναν οφθαλμό. Πριν την εφαρμογή της έγχυσης έγινε παρακέντηση προσθίου θαλάμου για να αποφευχθεί η αύξηση της ΕΟΠ.

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες που καταγράφηκαν ήταν 192 και αφορούσαν όλους τους συμμετέχοντες. 6 ήταν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες που όμως ήταν άσχετες με τη θεραπεία ή ήταν απίθανο να σχετίζονται είτε με τη διαδικασία είτε με το ίδιο το φάρμακο. Δεν υπήρχαν γενικά θέματα ασφαλείας. Τα ζωτικά σημεία δεν εμφάνισαν κλινικά σημαντικές αλλαγές όπως και οι εργαστηριακοί έλεγχοι βρισκόνταν εντός φυσιολογικών ορίων. Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες παρενέργειες ήταν τοπικά οφθαλμολογικά συμβάματα. Τα συχνότερα ήταν η αύξηση της ΕΟΠ και η ενδοφθάλμια φλεγμονή, η οποία περιελάμβανε την φλεγμονή του προσθίου θαλάμου και την υαλίτιδα. Οι περισσότερες ενδοφθάλμιες φλεγμονές ήταν ήπιες και

σχετιζόντουσαν με τη θεραπεία. Μόνο 2 εκ των ασθενών με υαλίτιδα χρειάστηκε να λάβουν από του στόματος κορτικοστεροειδή. Ο ένας από τους ασθενείς που έλαβε την υψηλότερη δόση εμφάνισε 3 περιστατικά σοβαρής ραγοειδίτιδας και υπό αυτή τη σκέψη επιλέχθηκε η αμέσως χαμηλότερη δόση, δηλαδή η δόση 9×10^{10} vg/eye για να μελετηθεί στην ομάδα επέκτασης. Η αύξηση της ΕΟΠ συνέβη σε 10 ασθενείς (11 περιπτώσεις) , αλλά όλες ήταν παροδικές, οι περισσότερες ήπιες και η διαχείρισή τους έγινε χωρίς καμία περαιτέρω επίπτωση.

Δεν υπήρξε καμία συσχέτιση ανάμεσα στις ενδοφθάλμιες φλεγμονές και στην χυμική ή στην κυτταρική ανοσιακή απάντηση. Μία ήπια αύξηση των εξουδετερωτικών αντισωμάτων (Nabs) έναντι του AAV2 παρουσιάστηκε μετά την ενδοϋαλοειδική έγχυση, η οποία όμως αποδόθηκε περισσότερο στην προηγούμενη ύπαρξη αυτών πριν την θεραπεία.

Μία εβδομάδα μετά την θεραπεία ανευρίσκονταν στα δάκρυα ιικό φορτίο , το οποίο εξαφανίστηκε στις 2 εβδομάδες. Ο ιός δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα δείγμα ούρων και σε λίγους ασθενείς ανιχνεύτηκε στο αίμα αλλά σε μικρή ποσότητα.

Σημειώθηκε μία μέση βελτίωση του BCVA $-0,44$ logMAR (22 ETDRS γράμματα) στα μάτια που έλαβαν τη θεραπεία και $-0,49$ logMAR (24.5 ETDRS γράμματα) σε αυτά που δεν έλαβαν τη θεραπεία στα 5 χρόνια μετά τη λήψη της ενδοϋαλοειδικής έγχυσης συγκριτικά με την αρχική μέτρηση.

Χρησιμοποιήθηκε το Humphrey Visual Field SITA Standard 24-2 για την εκτίμηση των οπτικών πεδίων. Ωστόσο, τα περισσότερα από αυτά ήταν αναξιόπιστα. Το MD των ασθενών που έλαβαν τη δόση 9×10^{10} vg/eye έδειξε μία μέση βελτίωση 2.66 dB στα 5 χρόνια παρακολούθησης. Δεν υπήρξε σημαντική αλλαγή του PSD, αλλά υπήρξε στον ουδό του κεντρικού βοθρίου μία μέση βελτίωση 6.33dB. Η Octopus κινητική περιμετρία είχε αναξιόπιστα αποτελέσματα.

Στο OCT η πυκνότητα του RNFL μειώθηκε κατά μέσο όρο -7.92 από την αρχική μέτρηση.

Στις πρώτες 48 εβδομάδες αξιολογήθηκαν η χρωματική αντίληψη και η αντίθεση ευαισθησίας χωρίς, όμως, να παρουσιάσουν κάποια βελτίωση.

Τα οπτικά προκλητά δυναμικά προκαλούμενα από διάχυτο φως είχαν μία σταθερή πορεία στην περίοδο των 48 εβδομάδων, ενώ τα προκαλούμενα από οπτικό ερέθισμα ήταν μη ανιχνεύσιμα από την αρχή και συνέχισαν σε όλη τη διάρκεια. Το ηλεκτροαμφιβληστροειδογράφημα ήταν μη ανιχνεύσιμο στην εβδομάδα 48 σε όλους τους ασθενείς.

Συμπερασματικά, δεν εμφανίστηκαν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες που να συσχετίζονται είτε με το φάρμακο είτε με τη διαδικασία. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες που εμφανίστηκαν ήταν αναμενόμενες και οι συχνότερες ήταν η αύξηση της ΕΟΠ και η ενδοφθάλμια φλεγμονή. Η μελέτη έδειξε πως η ενδοϋαλοειδική έγχυση με το rAAV2-ND4 είναι ασφαλής και η κατάλληλη δοσολογία αποφασίστηκε να είναι η δόση 9×10^{10} vg/eye, η οποία είχε την καλύτερη απόδοση. Τέλος, προτάθηκε το θεραπευτικό παράθυρο να μην υπερβαίνει τα 2 χρόνια από την έναρξη της απώλειας της όρασης. (Vignal-Clermont et al., 2021)

3.6. Κλινική δοκιμή φάσης III (RESCUE)

Η RESCUE είναι μία πολυκεντρική, τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή, ελεγχόμενη με sham ένεση, κλινική δοκιμή φάσης III, η οποία στρατολόγησε ασθενείς με τη μιτοχονδριακή μετάλλαξη m.11778 G>A. Ο στόχος της μελέτης ήταν να εκτιμήσει την αποτελεσματικότητα μίας ενδοϋαλοειδικής έγχυσης rAAV2/2-ND4 (9×10^{10} vg/οφθαλμό σε 90 μ l) σε σύγκριση με μία sham ένεση. Οι ασθενείς έπρεπε να έχουν απώλεια όρασης έως 6 μήνες σε τουλάχιστον 1 μάτι και απώλεια όρασης όχι περισσότερο από 6 μήνες και στα 2 μάτια. Οι αξιολογήσεις της αποτελεσματικότητας έγιναν στην εβδομάδα 48 και 96 μετά τη λήψη της θεραπείας, όπου χρησιμοποιήθηκε η διαφορά στην αλλαγή του logMAR του BCVA.

Έγινε τυχαία διανομή είτε της γονιδιακής θεραπείας είτε της sham έγχυσης στον δεξιό οφθαλμό κάθε ασθενή και στη συνέχεια ο αριστερός οφθαλμός έλαβε την άλλη έγχυση.

Πριν την λήψη της θεραπείας πραγματοποιήθηκε η τυπική αντισηψία, εφαρμόστηκε τοπικό οφθαλμικό αναισθητικό και ένας παράγοντας που μειώνει την ΕΟΠ.

Κατά τη sham έγχυση το αμβλύ άκρο μίας σύριγγας εφαρμόστηκε στην θέση που θα πραγματοποιούνταν τυπικά η ενδοϋαλοειδική έγχυση.

Το πρωταρχικό αποτέλεσμα της μελέτης ήταν η διαφορά της αλλαγής του logMAR του BCVA (χρησιμοποιήθηκε ο πίνακας ETDRS) από την αρχική μέτρηση στην εβδομάδα 48 μετά τη θεραπεία ανάμεσα στους οφθαλμούς που έλαβαν τη γονιδιακή

θεραπεία και σε εκείνους που έλαβαν την sham έγχυση. Κλινικά σημαντική θεωρούνταν μία διαφορά της τάξης του $-0,3 \log\text{MAR}$ (15 ETDRS γράμματα).

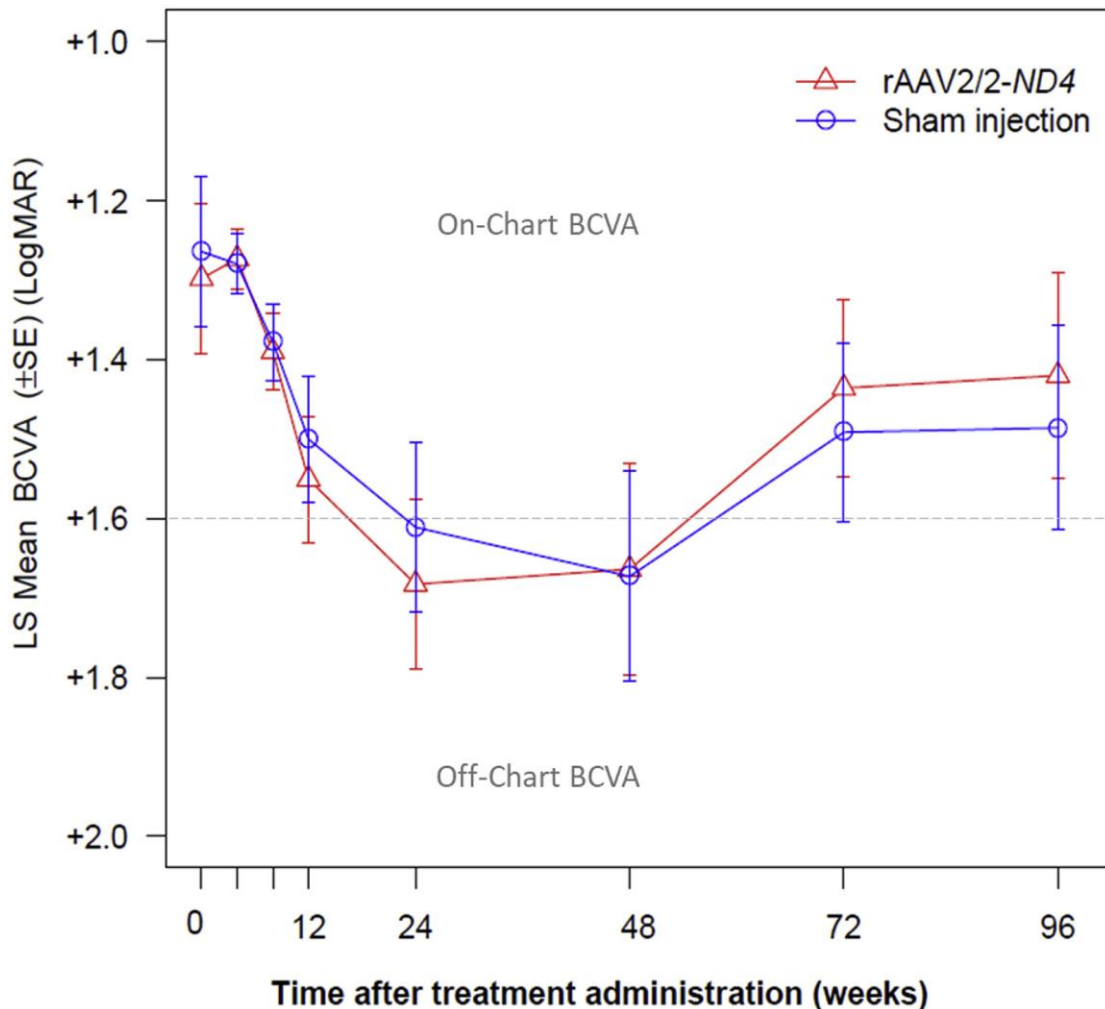
Το ναδίρ ορίστηκε ως το χειρότερο BCVA από την αρχή έως την εβδομάδα 96.

39 ασθενείς ξεκίνησαν στην συγκεκριμένη κλινική δοκιμή αλλά 35 ολοκλήρωσαν την διαδικασία μέχρι και την εβδομάδα 96.

Στην εβδομάδα 48, ο αρχικός στόχος δεν επετεύχθη καθώς η διαφορά στην αλλαγή του BCVA από την αρχική μέτρηση ανάμεσα στις 2 ομάδες δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Το BCVA επιδεινώθηκε παρόμοια και για τις 2 ομάδες.

Στην εβδομάδα 96, η διαφορά στην αλλαγή του BCVA από την αρχική μέτρηση ανάμεσα στα μάτια που τους χορηγήθηκε η γονιδιακή θεραπεία και σε εκείνα που δεν τους χορηγήθηκε και πάλι δεν ήταν στατιστικά σημαντική, ωστόσο σημειώθηκε παράλληλη βελτίωση στο τελικό BCVA και για τους οφθαλμούς που έλαβαν την ένεση και για αυτούς που δεν την έλαβαν.

Το 63% των θεραπευμένων με rAAV2/2-ND4 και το 55% των μη θεραπευμένων οφθαλμών παρουσίασαν μία βελτίωση τουλάχιστον $-0.3 \log\text{MAR}$ από το ναδίρ μέχρι την εβδομάδα 96.



Διάγραμμα 6. Η αλλαγή της μέσης τιμής από την αρχική μέτρηση σε logMAR του BCVA μέχρι 96 εβδομάδες μετά τη θεραπεία. Κόκκινη γραμμή: rAAV2/2-ND4 Μπλε γραμμή: ένεση sham (Newman et al., 2021)

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα άλλων λειτουργικών και δομικών παραμέτρων. Η ευαισθησία αντίθεσης είχε μία επιδείνωση μέχρι την εβδομάδα 48 αλλά στη συνέχεια βελτιώθηκε μέχρι την εβδομάδα 96. Το 55% των οπτικών πεδίων κρίθηκαν ως ακατάλληλα, ωστόσο φαίνεται πως το MD είχε μία επιδείνωση από την αρχή μέχρι την εβδομάδα 48 αλλά μετά σταθεροποιήθηκε. Η στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων μειώθηκε από την αρχική μέτρηση και στα 2 γκρουπ.

Η αλλαγή στην ποιότητα της ζωής αξιολογήθηκε με το National Eye Institute Visual Function Questionnaire 25. Τα σκορ που αυξήθηκαν ήταν της ψυχικής υγείας, της εξάρτησης και των δυσκολιών όσον αφορά τους ρόλους. Δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στις κοντινές δραστηριότητες, στις κοινωνικές λειτουργίες και στο σύνθετο

σκορ. Οι τιμές που επιδεινώθηκαν ήταν αυτές για τις μακρινές δραστηριότητες και για την περιφερική όραση.

Τα δεδομένα ασφαλείας στην εβδομάδα 96 έδειξαν πως η πιο συχνή ανεπιθύμητη ενέργεια μετά τη θεραπεία ήταν η ενδοφθάλμια φλεγμονή (74%), η οποία ήταν ήπια σε 22 μάτια και μέτρια σε 7. Δεν χορηγήθηκε προφυλακτική θεραπεία με στεροειδή πριν ή αμέσως μετά την έγχυση. Πρόσθια ραγοειδίτιδα αναφέρθηκε στο 56% και ενδιάμεση στο 64%. Το 5% των ασθενών που έλαβαν την sham έγχυση ανέπτυξαν ήπια φλεγμονή προσθίου θαλάμου. Στο 33% των ασθενών αναφέρθηκε ήπια αύξηση της ΕΟΠ στα μάτια που έλαβαν την γονιδιακή θεραπεία. Στις 2 εβδομάδες μετά τη θεραπεία αξιολογήθηκε η βιοδιασπορά του ιικού φορέα, όπου μόνο 2 ασθενείς ήταν θετικοί στην ύπαρξη DNA. (Newman et al., 2021)

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και οι δύο ομάδες έφτασαν στα χειρότερα αποτελέσματα μέχρι την εβδομάδα 24, από εκεί και μέχρι την εβδομάδα 48 ακολούθησε μία φάση πλατό ενώ η οπτική οξύτητα καλυτέρευσε σε σχέση με την φάση πλατό μέχρι την εβδομάδα 96. Από τη μέτρηση ναδίρ έως την εβδομάδα 96 υπήρξε στατιστικά σημαντική βελτίωση και στα 2 γκρουπ. Ωστόσο, το αρχικό ερώτημα το οποίο ήταν εάν είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά της αλλαγής του BCVA ανάμεσα στα 2 γκρουπ ήταν αρνητική, λόγω αυτής της παράλληλης βελτίωσης και των 2 οφθαλμών. (Newman et al., 2021)

3.7. Κλινική δοκιμή φάσης III (REVERSE)

Η Reverse είναι μία πολυκεντρική, τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή, ελεγχόμενη με sham ένεση, κλινική δοκιμή φάσης III, στην οποία εντάχθηκαν 37 ασθενείς που έπασχαν από LHON και έφεραν τη μιτοχονδριακή μετάλλαξη m.11778 G>A. Ο στόχος της μελέτης ήταν η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας μίας ενδοϋαλοειδικής έγχυσης rAAV2/2-ND4 σε ασθενείς με απώλεια όρασης και στους δύο οφθαλμούς τους τελευταίους 6 έως 12 μήνες. Οι τελικές αξιολογήσεις της αποτελεσματικότητας έγιναν την εβδομάδα 96 μετά τη λήψη της θεραπείας, όπου χρησιμοποιήθηκε η αλλαγή του logMAR του BCVA.

Έγινε τυχαία διανομή είτε της γονιδιακής θεραπείας είτε της sham έγχυσης στον δεξιό οφθαλμό κάθε ασθενή και στη συνέχεια ο αριστερός οφθαλμός έλαβε την άλλη έγχυση που δεν δόθηκε στο δεξί.

Πριν την λήψη της θεραπείας πραγματοποιήθηκε η τυπική αντισηψία, εφαρμόστηκε τοπικό οφθαλμικό αναισθητικό και ένας παράγοντας που μειώνει την ΕΟΠ.

Κατά τη sham έγχυση το αμβλύ άκρο μίας σύριγγας εφαρμόστηκε στην θέση που θα πραγματοποιούνταν τυπικά η ενδοϋαλοειδική έγχυση.

Κριτήρια ένταξης:

Οι ασθενείς έπρεπε να έχουν κάνει γονότυπο που να αποδεικνύει την ύπαρξη της μετάλλαξης m.11778 G>A στο γονίδιο MTND4 και την απουσία των πρωταρχικών μεταλλάξεων m.3460G>A στο γονίδιο MTND1 ή την m.14484T>C στο γονίδιο MTND6. Η ηλικία των ασθενών έπρεπε να είναι από 15 και πάνω και η διάρκεια της απώλειας της όρασης και στα δύο μάτια από 6 έως 12 μήνες. Η οπτική οξύτητα κάθε οφθαλμού έπρεπε να είναι μέτρηση δακτύλων ή περισσότερο.

Αποκλείστηκαν ασθενείς με

γλαύκωμα, άλλη οπτική νευροπάθεια, άλλη θεραπεία με οφθαλμικό γονίδιο, ιστορικό αμβλυωπίας, υαλοειδεκτομή σε οποιοδήποτε μάτι ή οφθαλμολογική εγχείρηση με κλινική συσχέτιση εντός 90 ημερών, άλλες μεταλλάξεις γονιδίων σχετικές με παθολογικές καταστάσεις του οπτικού νεύρου ή του αμφιβληστροειδούς. Εάν κάποιος ασθενής λάμβανε ιδεβενόνη, έπρεπε να διακοπεί τουλάχιστον 7 ημέρες πριν στρατολογηθεί.

37 ασθενείς εγγράφηκαν από το Φεβρουάριο του 2016 έως το Φεβρουάριο του 2017.

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν την εβδομάδα 48 έδειξαν πως η μέση τιμή της διαφοράς στην αλλαγή του BCVA ανάμεσα στις 2 ομάδες δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Κλινικά σημαντική διαφορά είχε οριστεί το 0.3 logMAR, οπότε φαίνεται πως ο πρωταρχικός στόχος δεν επετεύχθη. Ενώ συνέχισε να παρατηρείται σημαντική βελτίωση στην οπτική οξύτητα και των 2 ομάδων στην εβδομάδα 96, η μεταξύ τους διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Το ποσοστό των οφθαλμών που είχε σχετική κλινική απάντηση (CRR) ήταν 62% σε αυτούς που έλαβαν τη θεραπεία και 43% σε αυτούς που δεν την έλαβαν.

Από τους ασθενείς που είχαν αμφοτερόπλευρη βελτίωση του BCVA (78%) , το 41% είχε ταυτόχρονα βελτίωση και στα 2 μάτια, 44% είχε νωρίτερα στα μάτια που χορηγήθηκε η ενδοϋαλοειδική έγχυση και 15% νωρίτερα στα μάτια που έλαβαν την sham έγχυση.

Τα rAAV2/2-ND4 θεραπευμένα μάτια από το ναδίρ είχαν μέση βελτίωση 28.5 ETDRS γράμματα και τα μάτια που έλαβαν την sham έγχυση είχαν μέση βελτίωση 24.5 ETDRS γράμματα.

Δεν υπήρξε διαφορά στις παραμέτρους του OCT σε καμία ομάδα. Τέλος, η ποιότητα της ζωής που αξιολογήθηκε με το NEI VFQ-25 (National Eye Institute Visual Function Questionnaire-25) έδειξε στη σύνθετη βαθμολογία (composite score) μία βελτίωση της τάξης των 9.5 πόντων.

Ανεπιθύμητες ενέργειες:

Στα μάτια που έλαβαν την γονιδιακή θεραπεία ενδοφθάλμια φλεγμονή εντοπίστηκε στο 92% κυρίως πρόσθια ραγοειδίτιδα και ενδιάμεση ραγοειδίτιδα στο 68%, στους περισσότερους ήπιας μορφής. Στο 27% των ασθενών αναφέρθηκε ήπια αύξηση της ΕΟΠ, η οποία υποχώρησε με τη χορήγηση τυπικής θεραπείας, χωρίς την ανάπτυξη χρόνιας οφθαλμικής υπερτονίας ή γλαυκώματος. Δεν υπήρξε βιοδιασπορά του ιικού φορέα σε κανέναν ασθενή στις 2 εβδομάδες μετά τη θεραπεία, όπου έγινε η εκτίμηση.

Τα αποτελέσματα λοιπόν μας δείχνουν πως υπήρξε βελτίωση του τελικού BCVA και για τους οφθαλμούς που έλαβαν την θεραπεία και για αυτούς που δεν την έλαβαν. Ωστόσο, το αρχικό ερώτημα το οποίο ήταν εάν είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά της αλλαγής του BCVA ανάμεσα στα 2 γκρουπ ήταν αρνητική, λόγω αυτής της παράλληλης βελτίωσης και των 2 οφθαλμών. (Yu-Wai-Man et al., 2020)

Λόγω της αναπάντεχης αμφοτερόπλευρης βελτίωσης της οπτικής οξύτητας στους ασθενείς που έλαβαν τη γονιδιακή θεραπεία μονόπλευρα πραγματοποιήθηκε μία μελέτη με πρωτεύοντα θηλαστικά. Οι πίθηκοι μακάκοι (*Cynomolgus monkeys*) έλαβαν μία μονόπλευρη ενδοϋαλοειδική έγχυση του rAAV2-ND4 και 3 μήνες αργότερα ανιχνεύτηκε το DNA του ιού στον πρόσθιο θάλαμο, στον αμφιβληστροειδή και στο οπτικό νεύρο του οφθαλμού που δεν έλαβε τη θεραπεία. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν πως ένα ποσοστό του γενετικού υλικού μεταφέρεται από το

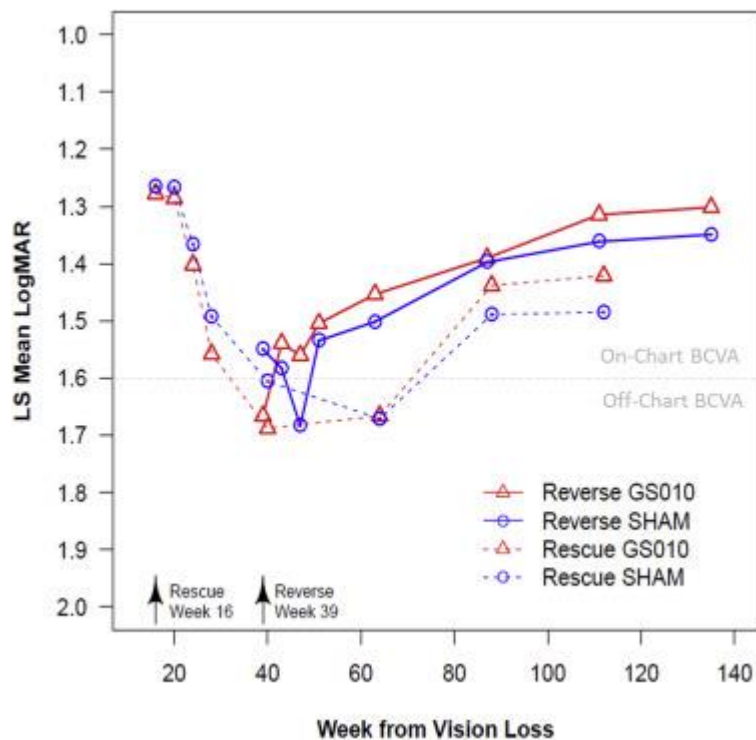
ένα οπτικό νεύρο στο άλλο. Ωστόσο, η ακριβής πορεία που ακολουθείται χρειάζεται περαιτέρω έλεγχο. (Yu-Wai-Man et al., 2020)

Η μεταφορά του ιικού φορέα μέσω του οπτικού χιάσματος αποτελεί μία εξήγηση της αμφοτερόπλευρης βελτίωσης της όρασης. Ένας άλλος υποθετικός μηχανισμός είναι η πλαστικότητα του εγκεφάλου, η οποία προτείνει πως οι περιοχές που είναι υπεύθυνες για την όραση μπορούν να συνεισφέρουν στην βελτίωση που παρατηρείται. Μία άλλη εξήγηση είναι η μεταφορά του AAV μέσω των νευρικών συνάψεων. Ακόμα είναι γνωστό πως τα μιτοχόνδρια έχουν την ικανότητα να μεταναστεύουν σε μεγάλες αποστάσεις στους νευρικούς άξονες. Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω έλεγχος για την αποσαφήνιση της διαδικασίας. (Yu-Wai-Man et al., 2020)

Σύγκριση των αποτελεσμάτων της Rescue και της Reverse

Από την αρχική μέτρηση του μέσου όρου του BCVA πριν τη θεραπεία φαίνεται πως οι ασθενείς της REVERSE είχαν ήδη φτάσει στο ναδίρ της οπτικής τους οξύτητας.

Η αμφοτερόπλευρη βελτίωση του BCVA ήταν πιο εμφανής από την εβδομάδα 48 έως την εβδομάδα 96 στους ασθενείς της RESCUE. Οι οφθαλμοί που έλαβαν την θεραπεία φαίνεται πως είχαν αμυδρά καλύτερα αποτελέσματα στη REVERSE από ότι στη RESCUE. Από την εβδομάδα 63.5 από την απώλεια της όρασης και έκτοτε φάνηκε πως υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην διαφορά της αλλαγής του BCVA ανάμεσα στις 2 κλινικές δοκιμές. Παρά την νωρίτερη χορήγηση της θεραπείας στους ασθενείς που έλαβαν μέρος στη RESCUE τα αποτελέσματα ήταν χειρότερα στις 96 εβδομάδες μετά τη θεραπεία συγκριτικά με αυτά που παρατηρήθηκαν στη REVERSE. Υπάρχει η πιθανότητα, χωρίς να είναι βέβαιο πως το οίδημα που παρατηρείται στο RNFL στα αρχικά στάδια της LHON αποτελεί φυσικό εμπόδιο για την απορρόφηση του rAAV2-ND4 από τα γαγγλιακά κύτταρα. (Newman et al., 2021)

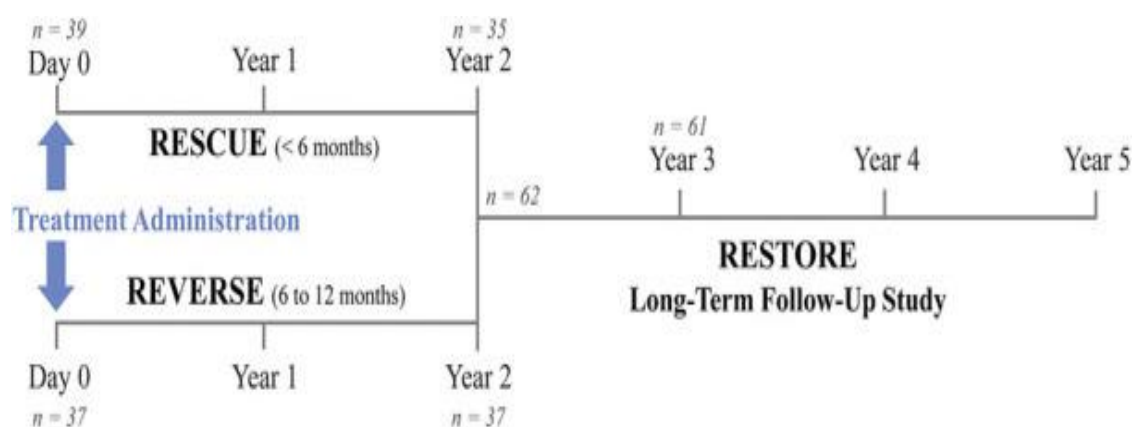


Διάγραμμα 7. Η εξέλιξη του logMAR BCVA στη RESCUE και στη REVERSE. (Newman et al., 2021)

3.8 Μελέτη παρακολούθησης (RESTORE)

Οι κλινικές δοκιμές RESCUE και REVERSE αναλύθηκαν ξεχωριστά η κάθε μία προηγουμένως. Ο συνολικός αριθμός των συμμετεχόντων ήταν 76 άτομα, τα οποία έλαβαν μία μονόπλευρη ενδοϋαλοειδική έγχυση του lenadogene polparnonec.96 εβδομάδες μετά το πέρας της θεραπείας οι ασθενείς είχαν τη δυνατότητα να συμμετέχουν σε μία καινούργια έρευνα με όνομα RESTORE, στην οποία θα γινόταν παρακολούθηση για άλλα 3 χρόνια. Από τους 76 συμμετέχοντες οι 61 πήραν μέρος στη RESTORE, η οποία αποτέλεσε μία μακράς διάρκειας μελέτη παρακολούθησης. Το BCVA εκφρασμένο σε logMAR και η ποιότητα της ζωής σε σχέση με την όραση εκτιμήθηκαν σε μία περίοδο 52 μηνών μετά την έναρξη της απώλειας της όρασης. Η ποιότητα της ζωής σε σχέση με την όραση αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας το VFQ-25 (visual function questionnaire-25). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπήρξε μία σταθερή και προοδευτική βελτίωση στο BCVA μέσα στο διάστημα της μελέτης, αναφορικά 48 μήνες μετά την έναρξη της απώλειας της όρασης το BCVA ήταν 1.26logMAR. Φαίνεται πως υπήρξε πρόοδος και στο μέσο VFQ-25, καθώς η σύνθετη βαθμολογία αυξήθηκε κατά 7 πόντους στα 3 χρόνια μετά τη θεραπεία συγκριτικά με

τις αρχικές μετρήσεις. Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι πως τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις 2 κλινικές δοκιμές, τη RESCUE και τη REVERSE, παρέμειναν και στη RESTORE. Η αποτελεσματικότητα μίας μονόπλευρης ενδοϋαλοειδικής έγχυσης στην οπτική οξύτητα και στην ποιότητα της ζωής ήταν κλινικά σημαντική και ακολούθησε μία σταθερή πορεία στα 4.3 χρόνια μετά την έναρξη της απώλειας της όρασης. Είναι σημαντικό να υπάρχουν μακροπρόθεσμα οφέλη σε μία γονιδιακή θεραπεία, καθώς η σκέψη είναι να χορηγείται άπαξ. (Biousse et al., 2021)



Εικόνα 6. Ο σχεδιασμός της RESCUE και της REVERSE και της μελέτης παρακολούθησης μακράς διάρκειας RESTORE. (Biousse et al., 2021)

Τα παραπάνω αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν τον Σεπτέμβριο του 2021, ωστόσο η RESTORE ολοκληρώθηκε τον Ιούλιο του 2022. Το κυριότερο ερώτημα της έρευνας ήταν οι ανεπιθύμητες ενέργειες ή οι σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, είτε οφθαλμικές είτε συστηματικές μέχρι 5 χρόνια μετά τη θεραπεία, η έρευνα έχει ολοκληρωθεί αλλά τα τελικά της αποτελέσματα δεν έχουν δημοσιευτεί ακόμα. (RESCUE and REVERSE Long-Term Follow-up - Full Text View - ClinicalTrials.Gov, n.d.)

3.9. Κλινική δοκιμή φάσης III (REFLECT)

Η Reflect είναι μία τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο (placebo) , φάσης III κλινική δοκιμή, στην οποία αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια μιας αμφοτερόπλευρης ενδοϋαλοειδικής έγχυσης της γονιδιακής θεραπείας με το lenadogene nolparnovec για τη θεραπεία της

LHON που προκλήθηκε από τη μιτοχονδριακή μετάλλαξη 11778G>A στο γονίδιο MT-ND4.

98 ασθενείς με την προαναφερθείσα μετάλλαξη, με απώλεια όρασης ≤ 1 έτος σε έναν ή και στους δύο οφθαλμούς ξεκίνησαν την δοκιμή, ωστόσο, οι 94 ολοκλήρωσαν την παρακολούθηση του 1.5 έτους.

Η κλινική δοκιμή αποτελούνταν από 2 σκέλη. Στο πρώτο συμμετείχαν 48 ασθενείς, οι οποίοι έλαβαν τη γονιδιακή θεραπεία αμφοτερόπλευρα (TARM1) και 50 ασθενείς, στους οποίους χορηγήθηκε μονόπλευρα (TARM2) ενώ το άλλο μάτι έλαβε εικονικό φάρμακο (placebo). Σε όλους τους ασθενείς πραγματοποιήθηκε ενδοϋαλοειδική έγχυση rAAV2-ND4 σε δοσολογία 9×10^{10} vg/οφθαλμό στο μάτι που προσβλήθηκε πρώτο, ενώ στον δεύτερο (είτε είχε απώλεια όρασης είτε όχι) έγινε τυχαία επιλογή ανάμεσα στο προαναφερθέν φάρμακο ή στο εικονικό.

Πριν την ένεση πραγματοποιήθηκε τοπική αντισηψία, αναισθησία και διαστολή της κόρης, επίσης είχε χορηγηθεί νωρίτερα ένας παράγοντας που μειώνει την ΕΟΠ. 2 ημέρες πριν την διαδικασία ξεκίνησαν όλοι οι ασθενείς μία θεραπεία με από του στόματος κορτικοστεροειδή για 28 ημέρες.

Κριτήρια αποκλεισμού: άλλες οφθαλμικές παθήσεις που θα εμπόδιζαν τη σωστή ανάλυση των αποτελεσμάτων, άρνηση του ασθενή για διακοπή της ιδεβενόνης ή μη σωστή συμμόρφωση με το πρωτόκολλο.

Το πρωταρχικό αποτέλεσμα που εκτιμήθηκε ήταν η διαφορά στην αλλαγή του BCVA από την αρχική μέτρηση στον 1.5 χρόνο στα δεύτερα μάτια, ανάμεσα σε αυτά που έλαβαν τη θεραπεία και σε αυτά που έλαβαν το εικονικό φάρμακο. Μία στατιστικά σημαντική διαφορά λογιζόταν το $-0.3 \log \text{MAR}$ (15 ETDRS γράμματα).

Η μέση τιμή της αλλαγής του BCVA από την αρχική μέτρηση στον 1.5 χρόνο για τα δεύτερα μάτια του TARM1 και του TARM2 δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά οπότε το πρωταρχικό ερώτημα δεν έφτασε στα επιθυμητά αποτελέσματα.

Σημειώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε όλες τις ομάδες των οφθαλμών που έλαβαν την γονιδιακή θεραπεία στη μέτρηση του BCVA στον 1.5 χρόνο σε σχέση με την αρχική μέτρηση. Η βελτίωση στη μέση τιμή του BCVA στον 1.5 χρόνο συγκριτικά με το ναδίρ ήταν στατιστικά σημαντική για όλα τα μάτια, ακόμα για αυτά που έλαβαν το εικονικό φάρμακο. Στην ομάδα στην οποία χορηγήθηκε η γονιδιακή

θεραπεία αμφοτερόπλευρα το ποσοστό των ασθενών που ο ένας ή και οι δύο οφθαλμοί ήταν on-chart (ήταν ικανοί να διακρίνουν γράμματα στο οπτότυπο ETDRS) στον 1.5 χρόνο ήταν 85.4% ενώ σε αυτούς που έλαβαν μονόπλευρα τη θεραπεία το ποσοστό ήταν 72.0%. Η θεραπεία δεν εμφάνισε συστηματικές ανεπιθύμητες ενέργειες και ήταν καλά ανεκτή. Στο 70.7% των ασθενών που έλαβαν τη γονιδιακή θεραπεία εμφανίστηκε ενδοφθάλμια φλεγμονή, η οποία ήταν κυρίως ήπια και καλά ελεγχόμενη με τοπικά κορτικοστεροειδή, ενώ σε εκείνους που έλαβαν το εικονικό φάρμακο παρουσιάστηκε μόνο στο 10.2%. Για τους οφθαλμούς στους οποίους χορηγήθηκε το rAAV2-ND4 δεν υπήρξε διαφορά στην επίπτωση της φλεγμονής ανάμεσα στην αμφοτερόπλευρη και στη μονόπλευρη ομάδα.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται κάποια δευτερεύοντα αποτελέσματα. Το 50% των αμφοτερόπλευρα θεραπευμένων ασθενών και το 48% των μονόπλευρα θεραπευμένων έδειξε στατιστικά σημαντική βελτίωση στην ευαισθησία αντίθεσης από το ναδίρ στον 1.5 χρόνο μετά τη θεραπεία. Συνολικά οι παράμετροι των οπτικών πεδίων ήταν σταθερές. Στο OCT φάνηκε λεπύτωση στη στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων σε όλους τους ασθενείς, αλλά μεγαλύτερη ήταν στους οφθαλμούς που έλαβαν το εικονικό φάρμακο (placebo). Τέλος, από την εκτίμηση του VFQ-25 φάνηκε μία κλινικά σημαντική βελτίωση στην ποιότητα της ζωής που σχετίζεται με την όραση, συγκρίνοντας τις αρχικές βαθμολογίες με αυτές στον 1.5 χρόνο μετά.

Η REFLECT είναι η 3^η κλινική δοκιμή φάσης III, η οποία μελέτησε την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της συγκεκριμένης γονιδιακής θεραπείας αλλά είναι η μοναδική στην οποία εκτιμήθηκε η αποτελεσματικότητα μίας αμφοτερόπλευρης έγχυσης. Σε συμφωνία με τη RESCUE και τη REVERSE η REFLECT εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στο BCVA που μετρήθηκε 1.5 χρόνο μετά τη θεραπεία και σε αυτό του ναδίρ σε όλες τις ομάδες των οφθαλμών, συμπεριλαμβανομένου της ομάδας placebo. Επικυρώνοντας έτσι, την αμφοτερόπλευρη βελτίωση μίας μονόπλευρης ένεσης, η οποία φάνηκε και στις άλλες δύο κλινικές δοκιμές. Η βελτίωση του BCVA και του LogCS ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς της αμφοτερόπλευρης ομάδας από ότι στη μονόπλευρη. Τα πρώτα μάτια συγκρινόμενα με τα δεύτερα είτε του TARM1 είτε του TARM2 είχαν καλύτερα αποτελέσματα στο BCVA. Αυτή η υπεροχή των οφθαλμών με απώλεια όρασης από 6 έως 12 μήνες είχε ήδη αναδειχτεί και στη σύγκριση των αποτελεσμάτων της RESCUE με τη REVERSE. Επίσης, υπήρξε συσχέτιση ανάμεσα στα καλύτερα τελικά

αποτελέσματα του MD του οπτικού πεδίου με τα καλύτερα τελικά αποτελέσματα του BCVA, όπως και της λιγότερης λέπτυνσης του GCL και των καλύτερων αποτελεσμάτων του BCVA στις τελικές μετρήσεις. Ίδιες συσχετίσεις βρέθηκαν και στις άλλες δύο κλινικές δοκιμές. Σε γενικές γραμμές, η rAAV2-ND4 ενδοϋαλοειδική έγχυση είχε ένα εξαιρετικό προφίλ ασφαλείας, με καλή ανεκτικότητα και για τις 2 ομάδες. Τέλος, στους ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε αμφοτερόπλευρα το φάρμακο είχαν καλύτερη απάντηση στη θεραπεία σε σχέση με αυτούς στους οποίους χορηγήθηκε μονόπλευρα. Η REFLECT, επομένως υποστηρίζει ένα καλύτερο προφίλ οφέλους/ρίσκου για την αμφοτερόπλευρη σε σχέση με τη μονόπλευρη ενδοϋαλοειδική έγχυση.(Newman et al., 2022)

Το Μάιο του 2022 στην ετήσια συνάντηση της Ένωσης Ερευνών για την Όραση και την Οφθαλμολογία (ARVO) παρουσιάστηκαν περιληπτικά τα αποτελέσματα των 2 ετών της κλινικής δοκιμής REFLECT. Συγκεκριμένα, σε όλους τους οφθαλμούς που τους χορηγήθηκε η ένεση υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά του BCVA στα 2 χρόνια μετά συγκριτικά με την αρχική μέτρηση. Σε όλα τα μάτια συμπεριλαμβανομένων αυτών που έλαβαν το εικονικό φάρμακο υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στο BCVA από το ναδίρ. Σε αυτούς που πήραν το φάρμακο αμφοτερόπλευρα υπήρξε καλύτερη μέση τιμή του BCVA συγκριτικά με αυτούς που το πήρανε μονόπλευρα. Διατηρήθηκε στα 2 χρόνια μετά τη θεραπεία η βελτίωση του BCVA από την αρχική και από τη ναδίρ μέτρηση. Η βελτίωση των οφθαλμών στους οποίους χορηγήθηκε το εικονικό φάρμακο είναι σύμφωνη με αυτή των άλλων 2 φάσης III κλινικών δοκιμών. Τα αποτελέσματα της REFLECT προτείνουν μία δοσοεξαρτώμενη επίδραση με την αμφοτερόπλευρη έγχυση του lenadogene polparnonoc. Η έρευνα φαίνεται πως είναι ακόμα ενεργή αλλά δεν στρατολογεί ασθενείς.

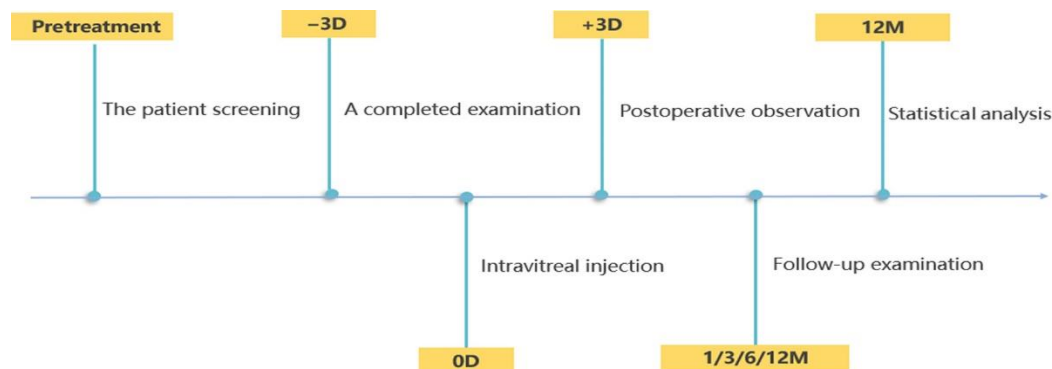
3.10. Κλινική δοκιμή φάσης II/III (NCT03153293)

Τον Μάιο του 2017 ξεκίνησε μία ανοιχτή, single-arm, πολυκεντρική έρευνα (NCT03153293), φάσης II/III, η οποία στρατολόγησε 159 ασθενείς με LHON με τη μετάλλαξη G11778A, οι οποίοι έλαβαν μία ενδοϋαλοειδική έγχυση του rAAV2-ND4 σε δόση 1×10^{10} vg/0.05ml. Ο σκοπός της είναι να αξιολογήσει την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της έγχυσης μέσω της σύγκρισης του αρχικού BCVA με αυτού 12 μήνες μετά τη θεραπεία και του οπτικού πεδίου στην ίδια χρονική περίοδο. Περαιτέρω αποτελέσματα τα οποία θα αξιολογηθούν αφορούν τα οπτικά προκλητά

δυναμικά (VEP) , τη στιβάδα των νευρικών αξόνων (RNFL), καθώς και την νεφρική και την ηπατική λειτουργία. Δεν έχουν δημοσιοποιηθεί ακόμα όλα τα αποτελέσματα της έρευνας καθώς αυτή βρίσκεται ακόμα σε ενεργή κατάσταση χωρίς να στρατολογεί όμως ασθενείς και αναμένεται να ολοκληρωθεί το 2025.(*A Single Intravitreal Injection of RAAV2-ND4 for the Treatment of Leber's Hereditary Optic Neuropathy - Full Text View - ClinicalTrials.Gov*, n.d.)

Οι Liu H. Et al, ξεκίνησαν μία μελέτη, στην οποία συμμετείχαν 149 ασθενείς οι οποίοι νωρίτερα είχαν λάβει μέρος στην κλινική δοκιμή με αριθμό ταυτοποίησης NCT03153293 (αναφέρεται προηγουμένως), όπου έλαβαν μία ενδοϋαλοειδική έγχυση του rAAV2-ND4 στον έναν από τους 2 οφθαλμούς. Τα αποτελέσματα αυτής της κλινικής δοκιμής έδειξαν πως κάποιοι ασθενείς παρουσίασαν βελτίωση μέσα σε 3 ημέρες, η οποία ήταν σταθερή και κατά την διάρκεια της παρακολούθησης. Αυτό οδήγησε τους επιστήμονες να διεξάγουν την μελέτη που περιγράφεται στη συνέχεια. 54 από τους 149 ασθενείς μέσα σε διάστημα 3 ημερών από τη θεραπεία είχαν σημαντική βελτίωση ($>0,3 \log \text{MAR}$) της οπτικής οξύτητας σε τουλάχιστον 1 μάτι. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 2 ομάδες, ανάλογα με το χρόνο ανταπόκρισης στη θεραπεία, δηλαδή αν υπήρξε σημαντική και γρήγορη βελτίωση στην οπτική οξύτητα μέσα σε 3 ημέρες από τη θεραπεία ή όχι. Ο συνολικός ρυθμός της σημαντικής και γρήγορης βελτίωσης του BCVA ήταν 36.24%. Σημαντική βελτίωση παρουσίασαν 26 ασθενείς οι οφθαλμοί των οποίων έλαβαν τη γονιδιακή θεραπεία και 11 ασθενείς οι οφθαλμοί των οποίων δεν την έλαβαν. Οι ακόλουθοι παράγοντες αξιολογήθηκαν: η ηλικία, η περίοδος ανάμεσα στην έναρξη της ασθένειας και τη θεραπεία και η αρχική τιμή της μέτρησης του BCVA , του VFI και του GRNFL. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σημαντική συσχέτιση με τη γρήγορη βελτίωση για τους οφθαλμούς στους οποίους χορηγήθηκε η ενδοϋαλοειδική έγχυση είχαν η ηλικία, η περίοδος ανάμεσα στην έναρξη της ασθένειας και τη θεραπεία, και η αρχική τιμή της μέτρησης του BCVA προτού ληφθεί η γονιδιακή θεραπεία. Σε αυτούς που δεν χορηγήθηκε η έγχυση παρουσίασαν, επίσης, σημαντική συσχέτιση οι προαναφερθέντες παράγοντες εκτός της ηλικίας. Ωστόσο η αρχική τιμή της μέτρησης του VFI και του GRNFL δεν έδειξαν καμία σημαντική συσχέτιση σε κανέναν οφθαλμό. Έτσι, οι ερευνητές κατέληξαν πως πιθανοί προγνωστικοί παράγοντες της γρήγορης και σημαντικής

ανάκτησης της όρασης είναι η περίοδος ανάμεσα στην έναρξη της νόσου και στην θεραπεία και η αρχική οπτική οξύτητα πριν τη λήψη της θεραπείας(Liu et al., 2020)



Διάγραμμα 8. Διάγραμμα ροής της γονιδιακής θεραπείας στην κληρονομική οπτική νευροπάθεια Leber: -3D: 3 ημέρες πριν τη θεραπεία, 0D: ενδοϋαλοειδική έγχυση, +3D: 3 ημέρες μετά την ένεση, 1/3/6M : 1 μήνα, 3 μήνες , 6 μήνες μετά την ένεση, 12M: 12 μήνες μετά την ένεση. (Liu et al., 2020)

Στην ετήσια συνάντηση του American Academy of Ophthalmology το 2019, παρουσιάστηκαν περαιτέρω αποτελέσματα αυτής της προοδευτικής ανοιχτής μελέτης. Το σύνολο των ασθενών που έλαβαν μία ενδοϋαλοειδική έγχυση rAAV2-ND4 ήταν 159, ηλικίας 7-45. Για τουλάχιστον 1 χρόνο παρακολούθηθηκαν οι 106 ασθενείς, το 63% αυτών είχε βελτίωση του BCVA ($\geq 0.3 \log \text{MAR}$), δηλαδή κλινικά σημαντική διαφορά. Ο μέσος όρος βελτίωσης ήταν 0.6 logMAR στα θεραπευμένα μάτια και 0.9 σε εκείνα που δεν έλαβαν τη θεραπεία. Ωστόσο στη μελέτη συμμετείχαν ασθενείς των οποίων η έναρξη της ασθένειας ήταν στην παιδική ηλικία, στους οποίους η αυτόματη ανάκτηση της όρασης είναι πιο συχνή. Το ποσοστό των ασθενών αυτών δεν είχε διευκρινιστεί. (Newman et al., 2021)

Στη συνέχεια αναφέρεται μία αναδρομική ανάλυση που χρησιμοποίησε δεδομένα 53 ασθενών με LHON, και μετάλλαξη G11778A στο γονίδιο ND4 οι οποίοι συμμετείχαν στην κλινική δοκιμή με αριθμό ταυτοποίησης NCT03153293 και έλαβαν μία ενδοϋαλοειδική έγχυση σε έναν οφθαλμό.

Κριτήρια ένταξης: φυσιολογικά αποτελέσματα γενικού ελέγχου και εκτός από την οπτική νευροπάθεια καμία άλλη οφθαλμολογική ανωμαλία.

Κριτήρια αποκλεισμού: η χρήση άλλων θεραπειών εντός 6 μηνών, η οποία θα μπορούσε να αλλοιώσει τα αποτελέσματα της γονιδιακής θεραπείας (ιδεβονόνη, βιταμίνες ή παραδοσιακά κινεζικά φάρμακα), ασθένειες είτε συστηματικές είτε οφθαλμολογικές οι οποίες είχαν επίδραση στην όραση, οι καπνίζοντες και οι βαριοί πότες, μετεγχειρητικές επιπλοκές που επηρέασαν την όραση του ασθενή και λιγότερο από 3 μήνες παρακολούθησης ή ατελή δεδομένα.

Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 2 ομάδες βάσει της βελτίωσης ή όχι του BCVA. $\geq 0.3\log\text{MAR}$ οριζόταν ως βελτίωση του BCVA ενώ $<0.3\log\text{MAR}$ ορίστηκε ως μη βελτίωση ή μείωση. Για τα οπτικά πεδία χρησιμοποιήθηκε το Humphrey visual field analyser, και το τεστ που πραγματοποιήθηκε ήταν το SITA fast 30-2. Στο 1^ο μήνα 24 ασθενείς έδειξαν βελτίωση στην οπτική οξύτητα, ενώ στους 3 μήνες 28. Αναλύθηκε η συσχέτιση της αλλαγής του BCVA στο 1^ο και στον 3^ο μήνα στα μάτια που έλαβαν τη θεραπεία συγκριτικά με τα αρχικά τους χαρακτηριστικά. Η μονομεταβλητή ανάλυση που πραγματοποιήθηκε έδειξε πως δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά σε κανέναν παράγοντα στον 1^ο μήνα ενώ υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές του VFI και του MD ανάμεσα στα 2 γκρουπ στους 3 μήνες μετά τη θεραπεία. Ένα μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του BCVA, του VFI και του MD για την ανάλυση ανεξάρτητων παραγόντων συσχέτισης για την πρόγνωση της οπτικής οξύτητας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στο BCVA των αρχικών μετρήσεων και στο BCVA 1 μήνα μετά και 3 μήνες μετά ($P= 0.016$ και $P=0.009$ αντίστοιχα), καθώς και στις αρχικές μετρήσεις του VFI και του VFI 1 μήνα μετά και 3 μήνες μετά ($P= 0.007$ και $P= 0.008$). Επίσης αποδείχτηκε ότι το VFI και το MD έχουν ισχυρή συσχέτιση (Spearman correlation coefficient 0.910).

Η κεντρική ιδέα πίσω από τη γονιδιακή θεραπεία είναι ότι ένα υγιές γονίδιο ενσωματώνεται στα αμφιβληστροειδικά γαγγλιακά κύτταρα και παράγει την επιθυμητή πρωτεΐνη. Σε ασθενείς με καλύτερη αρχική οπτική οξύτητα η ποσότητα των λειτουργικών RGCs είναι μεγαλύτερη οπότε παράγεται περισσότερη πρωτεΐνη. Το αποτέλεσμα που προκύπτει είναι πως το αρχικό BCVA και το VFI είναι ανεξάρτητοι, πιθανώς θετικοί προγνωστικοί παράγοντες της οπτικής οξύτητας. Επίσης, το MD έχει ισχυρή συσχέτιση με το VFI, οπότε ενδεχομένως και αυτό να αποτελεί προγνωστικό παράγοντα. Στη συγκεκριμένη έρευνα η διάρκεια της ασθένειας δεν φάνηκε να αποτελεί προγνωστικό παράγοντα, όπως ούτε και η ηλικία

έναρξης της ασθένειας. Ωστόσο, κάποιες έρευνες έχουν αποδείξει ότι υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην ηλικία έναρξης της ασθένειας και στην αυτόματη ανάκτηση της όρασης, ενώ σε άλλες φαίνεται ότι η πρόγνωση και στους ασθενείς με νεανική έναρξη είναι κακή.(Zhang et al., 2019)

3.11.Μη τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή

Από το Δεκέμβριο του 2017 έως το Φεβρουάριο του 2018 πραγματοποιήθηκε μία πολυκεντρική, προοδευτική, μη τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη κλινική δοκιμή με 40 ασθενείς που έπασχαν από την κληρονομική οπτική νευροπάθεια Leber λόγω της μιτοχονδριακής μετάλλαξης 11778G>A. Χορηγήθηκαν 0.05ml μίας ενδοϋαλοειδικής έγχυσης του rAAV2-ND4 σε δόση 1×10^{10} vg σε έναν οφθαλμό. Έγινε σύγκριση της οπτικής οξύτητας, των αλλαγών στην ΕΟΠ καθώς και των επιπλοκών ανάμεσα στους οφθαλμούς που έλαβαν τη θεραπεία και σε αυτούς που δεν την έλαβαν. Η οπτική οξύτητα αυξήθηκε σε 23 ασθενείς, Σε 13 περιπτώσεις σημειώθηκε βελτίωση αμφοτερόπλευρα, σε 6 περιπτώσεις στους οφθαλμούς της θεραπείας και 4 περιπτώσεις στην άλλη ομάδα. Η αποτελεσματικότητα ήταν 57,5%, αφού υπήρξε βελτίωση της οπτικής οξύτητας μετά τη θεραπεία σε 23 από τους 40 ασθενείς. Η διαφορά στην αλλαγή του BCVA από την αρχική μέτρηση στους 12 μήνες ήταν στατιστικά σημαντική και για τα 2 γκρουπ, ωστόσο η μεταξύ τους διαφορά στους 12 μήνες δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Επίσης, η συνολική διαφορά της ΕΟΠ πριν και μετά τη θεραπεία δεν είχε σημαντική διαφορά. Για την αποφυγή ανοσιακής απόρριψης δόθηκε προφυλακτική αγωγή με κορτικοστεροειδή (Bouquet et al., 2019) σε όλους τους ασθενείς 1 εβδομάδα πριν και 4 εβδομάδες μετά τη θεραπεία, και δεν παρατηρήθηκαν σοβαρές επιπλοκές. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν πως η συγκεκριμένη θεραπεία είναι ασφαλής και αποτελεσματική και πως η ενδοϋαλοειδική έγχυση του rAAV2-ND4 σε μόνο έναν οφθαλμό μπορεί να βελτιώσει την οπτική οξύτητα αμφοτερόπλευρα.(Xin et al., 2021)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα μέχρι τώρα δεδομένα από τις κλινικές δοκιμές που έχουν πραγματοποιηθεί καταλήγουν στο ότι η γονιδιακή θεραπεία με το AAV2-ND4 είναι ασφαλής και καλά ανεκτή. Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες είναι η οφθαλμική φλεγμονή, συνήθως ήπιας μορφής και η αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης. Η δοσολογία 9×10^{10} vg/οφθαλμό που χρησιμοποιήθηκε στις κλινικές δοκιμές φάσης III φάνηκε πως είναι καλά ανεκτή και αποτελεσματική, καθώς υπήρξε κλινικά σημαντική βελτίωση της οπτικής οξύτητας από το ναδίρ στην τελική μέτρηση και στις 3 δοκιμές. Το πρωταρχικό ερώτημα στη RESCUE και τη REVERSE ήταν η διαφορά της αλλαγής της οπτικής οξύτητας από την αρχική στην τελική μέτρηση ανάμεσα στους οφθαλμούς που έλαβαν τη θεραπεία και σε αυτούς που δεν την έλαβαν, ωστόσο δεν υπήρξε κλινικά σημαντική διαφορά λόγω της αναπάντεχης αμφοτερόπλευρης βελτίωσης της οπτικής οξύτητας με μία μονόπλευρη έγχυση. Επίσης, η σύγκριση των δύο ερευνών παρουσίαζε καλύτερα τελικά αποτελέσματα στους ασθενείς της REVERSE, οπότε θεωρήθηκε καταλληλότερο για τη θεραπεία το χρονικό διάστημα από την έναρξη της απώλειας της όρασης να είναι από 6 έως 12 μήνες. Η REFLECT είναι η πρώτη φάσης III κλινική δοκιμή που έλεγξε την αποτελεσματικότητα μίας αμφοτερόπλευρης ένεσης συγκριτικά με μία ένεση στον έναν οφθαλμό και λήψη εικονικού φαρμάκου στον άλλο. Υπήρξε βελτίωση της όρασης σε όλους τους οφθαλμούς, δεν φάνηκε σημαντική διαφορά ανάμεσα στους δεύτερους οφθαλμούς που έλαβαν την ενδοϋαλοειδική έγχυση και σε αυτούς που έλαβαν το placebo, το οποίο ήταν το πρωταρχικό ερώτημα. Οι πιο σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες της εξέλιξης της νόσου είναι ο γονότυπος και στη συνέχεια η ηλικία έναρξης της απώλειας της όρασης. Για τους ασθενείς που έλαβαν τη γονιδιακή θεραπεία υπήρξε συσχέτιση ανάμεσα στο αρχικό BCVA και το αρχικό VFI με την πρόγνωση της οπτικής οξύτητας. Πιθανοί προγνωστικοί παράγοντες της γρήγορης και σημαντικής ανάκτησης της όρασης μετά τη θεραπεία είναι η περίοδος ανάμεσα στην έναρξη της απώλειας της όρασης και της θεραπείας και η αρχική οπτική οξύτητα πριν τη λήψη της θεραπείας. Τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν πως η θεραπεία με AAV2-ND4 είναι ασφαλής, καλά ανεκτή και έχει καλά αποτελέσματα στην βελτίωση της όρασης. Αυτή τη στιγμή υπάρχουν κλινικές δοκιμές που δεν έχουν ολοκληρωθεί ακόμα. Μία

από τις κλινικές δοκιμές που βρίσκονται σε εξέλιξη είναι αυτή με τον αριθμό ταυτοποίησης NCT03153293, φάσης II/III που έχει ως στόχο την αξιολόγηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της ένεσης. Ορισμένα από τα αποτελέσματά της έχουν δημοσιοποιηθεί και αναλύονται στο προηγούμενο κεφάλαιο. Το 2021 ξεκίνησε η δοκιμή Gold, φάσης I/II/III, η οποία έχει ως στόχο τον προσδιορισμό της δόσης του NR082 και την εκτίμηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας του σε ασθενείς με LHON και μετάλλαξη στο γονίδιο ND4 . Τα αποτελέσματα δεν είναι διαθέσιμα αφού η μελέτη ακόμα βρίσκεται σε φάση ένταξης ασθενών και εκτιμάται πως θα ολοκληρωθεί το 2028 .(*Gene Therapy Clinical Trial for the Treatment Of Leber's Hereditary Optic Neuropathy - Full Text View - ClinicalTrials.Gov*, n.d.). Η μελέτη NCT05293626 δεν είναι ακόμα σε φάση στρατολόγησης αλλά εκτιμάται ότι θα ενταχθούν 18 ασθενείς με τη μετάλλαξη G11778A στο γονίδιο ND4. Το πλάνο της μελέτης στο αρχικό στάδιο είναι να πραγματοποιηθεί η ανεύρεση της κατάλληλης δοσολογίας του NR082, με αύξηση ή μείωση της αρχικής δόσης, αναλόγως των αποτελεσμάτων που θα προκύψουν. Ο πρωταρχικός στόχος είναι να φανεί το ενδεχόμενο ανεπιθύμητων ενεργειών, σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών και το ενδεχόμενο των DLT (dose limiting toxicity) μέσα σε 52 εβδομάδες από την έγχυση σε διαφορετικές δόσεις. Η έρευνα εκτιμάται πως θα ολοκληρωθεί το 2027. (*Gene Therapy Clinical Trial for the Treatment of Leber's Hereditary Optic Neuropathy Associated With ND4 Mutations - Full Text View - ClinicalTrials.Gov*, n.d.) Ενδεχομένως στο μέλλον να πραγματοποιηθούν κλινικές δοκιμές για την περαιτέρω αξιολόγηση της αμφοτερόπλευρης ενδοϋαλοειδικής έγχυσης με rAAV2-ND4 και κλινικές δοκιμές με ομάδα μαρτύρων που θα ακολουθεί τη φυσική εξέλιξη της LHON ταυτόχρονα με την παρακολούθηση ασθενών οι οποίοι θα έχουν λάβει τη γονιδιακή θεραπεία. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης η καταλληλότητα χορήγησης γονιδιακής θεραπείας στο άλλο μάτι σε ασθενείς στους οποίους έχει ήδη χορηγηθεί ενδοϋαλοειδική έγχυση στο ένα μάτι στο παρελθόν και εάν πραγματοποιηθεί ποιο θα είναι το χρονικό περιθώριο για τη λήψη της ένεσης στον άλλο οφθαλμό. Εν κατακλείδι η γονιδιακή θεραπεία για την κληρονομική οπτική νευροπάθεια Leber , αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη και ενδεχομένως τη μοναδική πραγματικά αποτελεσματική λύση για την σοβαρή απώλεια όρασης που αντιμετωπίζουν οι ασθενείς.

Συντομεύσεις:

BCVA: best corrected visual acuity= καλύτερα διορθούμενη οπτική οξύτητα

CRP= C-reactive protein

CS: contrast sensitivity= ευαισθησία αντίθεσης

dB: decibel

ERG: electroretinogram= ηλεκτροαμφιβληστροειδογράφημα

ETDRS: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study

GCL: ganglion cell layer = η στιβάδα των γαγγλιακών κυττάρων

HIV: Human Immunodeficiency Virus= Ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας

HVF: Humphrey visual field= οπτικό πεδίο Humphrey

IMD: Inherited mitochondrial diseases= κληρονομικές μιτοχονδριακές ασθένειες

LHON: Leber hereditary optic neuropathy= Κληρονομική οπτική νευροπάθεια Leber

logMAR: logarithm of minimal angle of resolution

MD: mean deviation= μέση απόκλιση

MRT: mitochondrial replacement techniques= τεχνικές αντικατάστασης μιτοχονδρίων

OCT: Optical Coherence Tomography= Οπτική Τομογραφία Συνοχής

OIS: Ocular Inflammation Score= Σκορ Οφθαλμικής Φλεγμονής

PSD: pattern standard deviation=

RNFL: retinal nerve fibre layer = η στιβάδα των νευρικών αξόνων του αμφιβληστροειδούς

VEP: visual evoked potentials=οπτικά προκλητά δυναμικά

VF: visual field= οπτικό πεδίο

VFI: visual field index= δείκτης οπτικού πεδίου

VFQ-25: National Eye Institute Visual Functioning Questionnaire 25

ΕΟΠ: ενδοφθάλμια πίεση

ΝΑΔ: νευροαμφιβληστροειδικός δακτύλιος

ΤΚΕ: ταχύτητα καθίζησης ερυθρών

Βιβλιογραφία

- A Single Intravitreal Injection of rAAV2-ND4 for the Treatment of Leber's Hereditary Optic Neuropathy - Full Text View - ClinicalTrials.gov.* (n.d.). Retrieved March 17, 2023, from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03153293>
- Balducci, N., Savini, G., Cascavilla, M. L., La Morgia, C., Triolo, G., Giglio, R., Carbonelli, M., Parisi, V., Sadun, A. A., Bandello, F., Carelli, V., & Barboni, P. (2016). Macular nerve fibre and ganglion cell layer changes in acute Leber's hereditary optic neuropathy. *British Journal of Ophthalmology*, *100*(9), 1232–1237. <https://doi.org/10.1136/BJOPHTHALMOL-2015-307326>
- Barboni, P., Carbonelli, M., Savini, G., Ramos, C. do V. F., Carta, A., Berezovsky, A., Salomao, S. R., Carelli, V., & Sadun, A. A. (2010). Natural history of Leber's hereditary optic neuropathy: longitudinal analysis of the retinal nerve fiber layer by optical coherence tomography. *Ophthalmology*, *117*(3), 623–627. <https://doi.org/10.1016/J.OPHTHA.2009.07.026>
- Barboni, P., Savini, G., Valentino, M. L., Montagna, P., Cortelli, P., De Negri, A. M., Sadun, F., Bianchi, S., Longanesi, L., Zanini, M., De Vivo, A., & Carelli, V. (2005). Retinal nerve fiber layer evaluation by optical coherence tomography in Leber's hereditary optic neuropathy. *Ophthalmology*, *112*(1), 120–126. <https://doi.org/10.1016/J.OPHTHA.2004.06.034>
- Barrera-Paez, J. D., & Moraes, C. T. (2023). Mitochondrial genome engineering coming-of-age: (Trends in Genetics, 38:869-880, 2022). *Trends in Genetics : TIG*, *39*(1), 89. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2022.08.002>
- Biousse, V., Newman, N. J., Yu-Wai-Man, P., Carelli, V., Moster, M. L., Vignal-Clermont, C., Klopstock, T., Sadun, A. A., Sergott, R. C., Hage, R., Esposti, S., La Morgia, C., Priglinger, C., Karanja, R., Blouin, L., Taiel, M., & Sahel, J. A. (2021). Long-Term Follow-Up After Unilateral Intravitreal Gene Therapy for Leber Hereditary Optic Neuropathy: The RESTORE Study. *Journal of Neuro-Ophthalmology*, *41*(3), 309. <https://doi.org/10.1097/WNO.0000000000001367>
- Bouquet, C., Vignal Clermont, C., Galy, A., Fitoussi, S., Blouin, L., Munk, M. R., Valero, S., Meunier, S., Katz, B., Sahel, J. A., & Thomasson, N. (2019). Immune Response and Intraocular Inflammation in Patients With Leber Hereditary Optic Neuropathy Treated With Intravitreal Injection of Recombinant Adeno-Associated Virus 2 Carrying the ND4 Gene: A Secondary Analysis of a Phase 1/2 Clinical Trial. *JAMA Ophthalmology*, *137*(4), 399–406. <https://doi.org/10.1001/JAMAOPHTHALMOL.2018.6902>
- Carelli, V., Carbonelli, M., De Coo, I. F., Kawasaki, A., Klopstock, T., Lagrèze, W. A., La Morgia, C., Newman, N. J., Orssaud, C., Pott, J. W. R., Sadun, A. A., Van Everdingen, J., Vignal-Clermont, C., Votruba, M., Yu-Wai-Man, P., & Barboni, P. (2017). International Consensus Statement on the Clinical and Therapeutic Management of Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Journal of Neuro-Ophthalmology : The Official Journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society*, *37*(4), 371–381. <https://doi.org/10.1097/WNO.0000000000000570>

- Catarino, C. B., & Klopstock, T. (2017). Use of Idebenone for the Treatment of Leber's Hereditary Optic Neuropathy: Review of the Evidence. *Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening*, 5. <https://doi.org/10.1177/2326409817731112>
- Chi, S. C., Cheng, H. C., & Wang, A. G. (2022). Leber Hereditary Optic Neuropathy: Molecular Pathophysiology and Updates on Gene Therapy. *Biomedicines*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10081930/S1>
- Cho, S. I., Lee, S., Mok, Y. G., Lim, K., Lee, J., Lee, J. M., Chung, E., & Kim, J. S. (2022). Targeted A-to-G base editing in human mitochondrial DNA with programmable deaminases. *Cell*, 185(10), 1764-1776.e12. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2022.03.039>
- Cwerman-Thibault, H., Augustin, S., Lechauve, C., Ayache, J., Ellouze, S., Sahel, J. A., & Corral-Debrinski, M. (2015). Nuclear expression of mitochondrial ND4 leads to the protein assembling in complex I and prevents optic atrophy and visual loss. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 2, 15003. <https://doi.org/10.1038/MTM.2015.3>
- Eells, J. T., Wong-Riley, M. T. T., VerHoeve, J., Henry, M., Buchman, E. V., Kane, M. P., Gould, L. J., Das, R., Jett, M., Hodgson, B. D., Margolis, D., & Whelan, H. T. (2004). Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. *Mitochondrion*, 4(5-6), 559-567. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2004.07.033>
- Emperador, S., López-Gallardo, E., Hernández-Ainsa, C., Habbane, M., Montoya, J., Bayona-Bafaluy, M. P., & Ruiz-Pesini, E. (2019). Ketogenic treatment reduces the percentage of a LHON heteroplasmic mutation and increases mtDNA amount of a LHON homoplasmic mutation. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1128-z>
- Enns, G. M., Kinsman, S. L., Perlman, S. L., Spicer, K. M., Abdenur, J. E., Cohen, B. H., Amagata, A., Barnes, A., Kheifets, V., Shrader, W. D., Thoolen, M., Blankenberg, F., & Miller, G. (2012). Initial experience in the treatment of inherited mitochondrial disease with EPI-743. *Molecular Genetics and Metabolism*, 105(1), 91-102. <https://doi.org/10.1016/J.YMGME.2011.10.009>
- Feuer, W. J., Schiffman, J. C., Davis, J. L., Porciatti, V., Gonzalez, P., Koilkonda, R. D., Yuan, H., Lalwani, A., Lam, B. L., & Guy, J. (2016). Gene Therapy for Leber Hereditary Optic Neuropathy: Initial Results. *Ophthalmology*, 123(3), 558-570. <https://doi.org/10.1016/J.OPHTHA.2015.10.025>
- Gene Therapy Clinical Trial for the Treatment Of Leber's HereDitary Optic Neuropathy - Full Text View - ClinicalTrials.gov*. (n.d.). Retrieved February 4, 2023, from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04912843>
- Gene Therapy Clinical Trial for the Treatment of Leber's Hereditary Optic Neuropathy Associated With ND4 Mutations - Full Text View - ClinicalTrials.gov*. (n.d.). Retrieved February 5, 2023, from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT05293626?cond=LHON+gene+therapy&drow=2&rank=2>
- Gonçalves, V. F. (2019). Mitochondrial Genetics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1158, 247-255. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8367-0_13

- Guy, J., Feuer, W. J., Davis, J. L., Porciatti, V., Gonzalez, P. J., Koilkonda, R. D., Yuan, H., Hauswirth, W. W., & Lam, B. L. (2017). GENE THERAPY FOR LEBER HEREDITARY OPTIC NEUROPATHY: LOW AND MEDIUM DOSE VISUAL RESULTS. *Ophthalmology*, *124*(11), 1621. <https://doi.org/10.1016/J.OPHTHA.2017.05.016>
- Guy, J., Qi, X., Pallotti, F., Schon, E. A., Manfredi, G., Carelli, V., Martinuzzi, A., Hauswirth, W. W., & Lewin, A. S. (2002). Rescue of a mitochondrial deficiency causing Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Annals of Neurology*, *52*(5), 534–542. <https://doi.org/10.1002/ANA.10354>
- Haefeli, R. H., Erb, M., Gemperli, A. C., Robay, D., Fruh, I., Anklin, C., Dallmann, R., & Gueven, N. (2011). NQO1-dependent redox cycling of idebenone: effects on cellular redox potential and energy levels. *PLoS One*, *6*(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0017963>
- Hage, R., & Vignal-Clermont, C. (2021). Leber Hereditary Optic Neuropathy: Review of Treatment and Management. *Frontiers in Neurology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2021.651639>
- Koilkonda, R. D., Chou, T. H., Porciatti, V., Hauswirth, W. W., & Guy, J. (2010). Induction of rapid and highly efficient expression of the human ND4 complex I subunit in the mouse visual system by self-complementary adeno-associated virus. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, *128*(7), 876–883. <https://doi.org/10.1001/ARCHOPHTHALMOL.2010.135>
- Koilkonda, R., Yu, H., Talla, V., Porciatti, V., Feuer, W. J., Hauswirth, W. W., Chiodo, V., Erger, K. E., Boye, S. L., Lewin, A. S., Conlon, T. J., Renner, L., Nuringer, M., Detrisac, C., & Guy, J. (2014). LHON gene therapy vector prevents visual loss and optic neuropathy induced by G11778A mutant mitochondrial DNA: biodistribution and toxicology profile. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *55*(12), 7739–7753. <https://doi.org/10.1167/IOVS.14-15388>
- Kurimoto, T., Ueda, K., Mori, S., Kamada, S., Sakamoto, M., Yamada-Nakanishi, Y., Matsumiya, W., & Nakamura, M. (2020). A Single-Arm, Prospective, Exploratory Study to Preliminarily Test Effectiveness and Safety of Skin Electrical Stimulation for Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(5). <https://doi.org/10.3390/JCM9051359>
- Lam, B. L., Feuer, W. J., Davis, J. L., Porciatti, V., Yu, H., Levy, R. B., Vanner, E., & Guy, J. (2022). Leber Hereditary Optic Neuropathy Gene Therapy: Adverse Events and Visual Acuity Results of All Patient Groups. *American Journal of Ophthalmology*, *241*, 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2022.02.023>
- Leruez, S., Verny, C., Bonneau, D., Procaccio, V., Lenaers, G., Amati-Bonneau, P., Reynier, P., Scherer, C., Prundean, A., Orssaud, C., Zanlonghi, X., Rougier, M. B., Tilikete, C., & Miléa, D. (2018). Cyclosporine A does not prevent second-eye involvement in Leber's hereditary optic neuropathy. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/S13023-018-0773-Y>
- Liu, H. li, Yuan, J. jia, Zhang, Y., Tian, Z., Li, X., Wang, D., Du, Y. yang, Song, L., & Li, B. (2020). Factors associated with rapid improvement in visual acuity in patients with Leber's

- hereditary optic neuropathy after gene therapy. *Acta Ophthalmologica*, 98(6), e730–e733. <https://doi.org/10.1111/AOS.14379>
- Manickam, A., Michael, M., & Ramasamy, S. (2017). Mitochondrial genetics and therapeutic overview of Leber's hereditary optic neuropathy. *Indian Journal of Ophthalmology*, 65(11), 1087–1092. https://doi.org/10.4103/IJO.IJO_358_17
- Martinelli, D., Catteruccia, M., Piemonte, F., Pastore, A., Tozzi, G., Dionisi-Vici, C., Pontrelli, G., Corsetti, T., Livadiotti, S., Kheifets, V., Hinman, A., Shrader, W. D., Thoolen, M., Klein, M. B., Bertini, E., & Miller, G. (2012). EPI-743 reverses the progression of the pediatric mitochondrial disease--genetically defined Leigh Syndrome. *Molecular Genetics and Metabolism*, 107(3), 383–388. <https://doi.org/10.1016/J.YMGME.2012.09.007>
- Mejia-Vergara, A. J., Seleme, N., Sadun, A. A., & Karanjia, R. (2020). Pathophysiology of Conversion to Symptomatic Leber Hereditary Optic Neuropathy and Therapeutic Implications: a Review. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 20(5). <https://doi.org/10.1007/S11910-020-01032-8>
- Meyerson, C., Van Stavern, G., & McClelland, C. (2015). Leber hereditary optic neuropathy: current perspectives. *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 9, 1165. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S62021>
- Morgan, M. A., Lange, L., & Schambach, A. (2022). Prime time for base editing in the mitochondria. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41392-022-01068-X>
- Moster, S. J., Moster, M. L., Bryan, M. S., & Sergott, R. C. (2016). Retinal Ganglion Cell and Inner Plexiform Layer Loss Correlate with Visual Acuity Loss in LHON: A Longitudinal, Segmentation OCT Analysis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57(8), 3872–3883. <https://doi.org/10.1167/IOVS.15-17328>
- Nakamura, M., & Yamamoto, M. (2000). Variable pattern of visual recovery of Leber's hereditary optic neuropathy. *The British Journal of Ophthalmology*, 84(5), 534–535. <https://doi.org/10.1136/BJO.84.5.534>
- Newman, N. J., Biousse, V., David, R., Bhatti, M. T., Hamilton, S. R., Farris, B. K., Lesser, R. L., Newman, S. A., Turbin, R. E., Chen, K., & Keaney, R. P. (2005). Prophylaxis for second eye involvement in leber hereditary optic neuropathy: an open-labeled, nonrandomized multicenter trial of topical brimonidine purite. *American Journal of Ophthalmology*, 140(3), 407.e1-407.e11. <https://doi.org/10.1016/J.AJO.2005.03.058>
- Newman, N. J., Carelli, V., Taiel, M., & Yu-Wai-Man, P. (2020). Visual Outcomes in Leber Hereditary Optic Neuropathy Patients With the m.11778G>A (MTND4) Mitochondrial DNA Mutation. *Journal of Neuro-Ophthalmology : The Official Journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society*, 40(4), 547–557. <https://doi.org/10.1097/WNO.0000000000001045>
- Newman, N. J., Yu-Wai-Man, P., Carelli, V., Moster, M. L., Biousse, V., Vignal-Clermont, C., Sergott, R. C., Klopstock, T., Sadun, A. A., Barboni, P., DeBusk, A. A., Girmens, J. F., Rudolph, G., Karanjia, R., Taiel, M., Blouin, L., Smits, G., Katz, B., Sahel, J. A., ... Massini, M. (2021). Efficacy and Safety of Intravitreal Gene Therapy for Leber Hereditary Optic

- Neuropathy Treated within 6 Months of Disease Onset. *Ophthalmology*, 128(5), 649–660. <https://doi.org/10.1016/J.OPHTHA.2020.12.012>
- Newman, N. J., Yu-Wai-Man, P., Subramanian, P. S., Moster, M. L., Wang, A.-G., Donahue, S. P., Leroy, B. P., Carelli, V., Biousse, V., Vignal-Clermont, C., Sergott, R. C., Sadun, A. A., Fernández, G. R., Chwalisz, B. K., Banik, R., Bazin, F., Roux, M., Cox, E. D., Taiel, M., & Sahel, J.-A. (2022). Randomized trial of bilateral gene therapy injection for m.11778G > A MT-ND4 Leber optic neuropathy. *Brain : A Journal of Neurology*. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWAC421>
- Perin, C., Vigano, B., Piscitelli, D., Matteo, B. M., Meroni, R., & Cerri, C. G. (2020). Non-invasive current stimulation in vision recovery: a review of the literature. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 38(3), 239–250. <https://doi.org/10.3233/RNN-190948>
- Pisano, A., Preziuso, C., Iommarini, L., Perli, E., Grazioli, P., Campese, A. F., Maresca, A., Montopoli, M., Masuelli, L., Sadun, A. A., d'Amati, G., Carelli, V., Ghelli, A., & Giordano, C. (2015). Targeting estrogen receptor β as preventive therapeutic strategy for Leber's hereditary optic neuropathy. *Human Molecular Genetics*, 24(24), 6921–6931. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDV396>
- RESCUE and REVERSE Long-term Follow-up - Full Text View - ClinicalTrials.gov*. (n.d.). Retrieved February 5, 2023, from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03406104?cond=LHON+gene+therapy&drow=2&rank=6>
- Rojas, J. C., Lee, J., John, J. M., & Gonzalez-Lima, F. (2008). Neuroprotective effects of near-infrared light in an in vivo model of mitochondrial optic neuropathy. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(50), 13511–13521. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3457-08.2008>
- Russell, S., Bennett, J., Wellman, J. A., Chung, D. C., Yu, Z. F., Tillman, A., Wittes, J., Pappas, J., Elci, O., McCague, S., Cross, D., Marshall, K. A., Walshire, J., Kehoe, T. L., Reichert, H., Davis, M., Raffini, L., George, L. A., Hudson, F. P., ... Maguire, A. M. (2017). Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, 390(10097), 849–860. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31868-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31868-8)
- Sadun, A. A., Chicani, C. F., Ross-Cisneros, F. N., Barboni, P., Thoolen, M., Shrader, W. D., Kubis, K., Carelli, V., & Miller, G. (2012). Effect of EPI-743 on the clinical course of the mitochondrial disease Leber hereditary optic neuropathy. *Archives of Neurology*, 69(3), 331–338. <https://doi.org/10.1001/ARCHNEUROL.2011.2972>
- Safety Study of an Adeno-associated Virus Vector for Gene Therapy of Leber's Hereditary Optic Neuropathy - Full Text View - ClinicalTrials.gov*. (n.d.). Retrieved February 5, 2023, from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02161380?cond=LHON+gene+therapy&drow=2&rank=3>
- Sehic, A., Guo, S., Cho, K. S., Corraya, R. M., Chen, D. F., & Utheim, T. P. (2016). Electrical Stimulation as a Means for Improving Vision. *The American Journal of Pathology*, 186(11), 2783–2797. <https://doi.org/10.1016/J.AJP.2016.07.017>

- Shemesh, A., Sood, G., & Margolin, E. (2022). Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON). *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482499/>
- Spiegel, S. J., & Sadun, A. A. (2022). Solutions to a Radical Problem: Overview of Current and Future Treatment Strategies in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21). <https://doi.org/10.3390/ijms232113205>
- Stem Cell Ophthalmology Treatment Study II - Full Text View - ClinicalTrials.gov*. (n.d.). Retrieved March 18, 2023, from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03011541?id=NCT03428178+OR+NCT03672968+OR+NCT03293524+OR+NCT03295071+OR+NCT03153293+OR+NCT03406104+OR+NCT02064569+OR+NCT02161380+OR+NCT05293626+OR+NCT04912843+OR+NCT02771379+OR+NCT02774005+OR+NCT03011541+OR+NCT01267422+OR+NCT02652780&draw=2&rank=9&load=cart>
- Storoni, M., Robert, M. P., & Plant, G. T. (2019). The therapeutic potential of a calorie-restricted ketogenic diet for the management of Leber hereditary optic neuropathy. *Nutritional Neuroscience*, 22(3), 156–164. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1368170>
- Stramkauskaitė, A., Povilaitytė, I., Glebauskienė, B., & Liutkevičienė, R. (2022). Clinical Overview of Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Acta Medica Lituanica*, 29(1), 9–18. <https://doi.org/10.15388/AMED.2022.29.1.19>
- Vignal, C., Uretsky, S., Fitoussi, S., Galy, A., Blouin, L., Girmens, J. F., Bidot, S., Thomasson, N., Bouquet, C., Valero, S., Meunier, S., Combal, J. P., Gilly, B., Katz, B., & Sahel, J. A. (2018). Safety of rAAV2/2-ND4 Gene Therapy for Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Ophthalmology*, 125(6), 945–947. <https://doi.org/10.1016/j.ophttha.2017.12.036>
- Vignal-Clermont, C., Girmens, J. F., Audo, I., Said, S. M., Errera, M. H., Plaine, L., O'Shaughnessy, D., Taiel, M., & Sahel, J. A. (2021). Safety of Intravitreal Gene Therapy for Treatment of Subjects with Leber Hereditary Optic Neuropathy due to Mutations in the Mitochondrial ND4 Gene: The REVEAL Study. *BioDrugs : Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 35(2), 201–214. <https://doi.org/10.1007/S40259-021-00468-9>
- Visual recovery in patients with Leber's hereditary optic neuropathy and the 11778 mutation - PubMed*. (n.d.). Retrieved March 13, 2023, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1532593/>
- Wan, X., Pei, H., Zhao, M.-J., Yang, S., Hu, W.-K., He, H., Ma, S.-Q., Zhang, G., Dong, X.-Y., Chen, C., Wang, D.-W., & Li, B. (2016). Efficacy and Safety of rAAV2-ND4 Treatment for Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/srep21587>
- Weiss, J. N., Levy, S., & Benes, S. C. (2016). Stem Cell Ophthalmology Treatment Study (SCOTS): bone marrow-derived stem cells in the treatment of Leber's hereditary optic neuropathy. *Neural Regeneration Research*, 11(10), 1685. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.193251>

- Wheeler, L., WoldeMussie, E., & Lai, R. (2003). Role of alpha-2 agonists in neuroprotection. *Survey of Ophthalmology*, *48 Suppl 1*(2 SUPPL. 1). [https://doi.org/10.1016/S0039-6257\(03\)00004-3](https://doi.org/10.1016/S0039-6257(03)00004-3)
- Wilensky, J. T. (1996). The role of brimonidine in the treatment of open-angle glaucoma. *Survey of Ophthalmology*, *41 Suppl 1*(SUPPL. 1). [https://doi.org/10.1016/S0039-6257\(96\)82026-1](https://doi.org/10.1016/S0039-6257(96)82026-1)
- Xin, L., Zhen, T., Zhang, C., Bin, L., & Yong, Z. (2021). Efficacy evaluation of intravitreal injection of rAAV2-iVD4 gene for Leber hereditary optic neuropathy. *Zhonghua Shiyan Yanke Zazhi/Chinese Journal of Experimental Ophthalmology*, *39*(8), 724–728. <https://doi.org/10.3760/CMA.J.CN115989-20210330-00218>
- Yang, S., Ma, S. qi, Wan, X., He, H., Pei, H., Zhao, M. jian, Chen, C., Wang, D. wen, Dong, X. yan, Yuan, J. jia, & Li, B. (2016). Long-term outcomes of gene therapy for the treatment of Leber’s hereditary optic neuropathy. *EBioMedicine*, *10*, 258–268. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2016.07.002>
- Yuan, J., Zhang, Y., Liu, H., Wang, D., Du, Y., Tian, Z., Li, X., Yang, S., Pei, H., Wan, X., Xiao, S., Song, L., Xiao, X., Sun, J., Wang, Z., & Li, B. (2020). Seven-Year Follow-up of Gene Therapy for Leber’s Hereditary Optic Neuropathy. *Ophthalmology*, *127*(8), 1125–1127. <https://doi.org/10.1016/J.OPHTHA.2020.02.023>
- Yu-Wai-Man, P., & Chinnery, P. F. (2021). Leber Hereditary Optic Neuropathy. *GeneReviews*®. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1174/>
- Yu-Wai-Man, P., Newman, N. J., Carelli, V., Moster, M. L., Biousse, V., Sadun, A. A., Klopstock, T., Vignal-Clermont, C., Sergott, R. C., Rudolph, G., la Morgia, C., Karanjia, R., Taiel, M., Blouin, L., Burguière, P., Smits, G., Chevalier, C., Masonson, H., Salermo, Y., ... Sahel, J. A. (2020). Bilateral visual improvement with unilateral gene therapy injection for Leber hereditary optic neuropathy. *Science Translational Medicine*, *12*(573). <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AA7423>
- Zhang, Y., Li, X., Yuan, J., Tian, Z., Liu, H., Wang, D., & Li, B. (2019). Prognostic factors for visual acuity in patients with Leber’s hereditary optic neuropathy after rAAV2-ND4 gene therapy. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, *47*(6), 774–778. <https://doi.org/10.1111/CEO.13515>
- Zhu, Q., Xiao, S., Hua, Z., Yang, D., Hu, M., Zhu, Y. T., & Zhong, H. (2021). Near Infrared (NIR) Light Therapy of Eye Diseases: A Review. *International Journal of Medical Sciences*, *18*(1), 109–119. <https://doi.org/10.7150/IJMS.52980>
- Bowling B. (2016). Kanski Κλινική Οφθαλμολογία: Μία συστηματική προσέγγιση (3^η ελληνική έκδοση)
- Snell, R., Lemp, M. (2006) . Κλινική ανατομία του οφθαλμού