

## **ВОЗМОЖНОСТИ КОРРЕКЦИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ МОРФО- ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ СЕТЧАТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

Поступил 20.04.14

Сетчатка – периферическое звено зрительного анализатора – представляет собой сложную систему, от адекватного функционирования которой зависит зрение. Утрата любого типа клеток сетчатки в результате какого-либо заболевания или травмы разрушает сложные нейронные цепи, играющие важнейшую роль в обеспечении зрительной функции. Для раскрытия механизмов, которые лежат в основе различных патологических процессов в сетчатке, приводящих у человека к наследственной или приобретенной потере зрения, используют моделирование соответствующих патологических состояний в экспериментах на лабораторных животных. Достижения молекулярной и клеточной биологии обеспечили существенный прогресс в создании новых методов терапии различных зрительных расстройств. В литературе описаны методики нейротрофической и генной терапии, применяемые в эксперименте. Успешное использование методов генной терапии на лабораторных животных позволило перейти к первой фазе клинических исследований при попытках лечения ретинобластомы, возрастной макулярной дегенерации и врожденного амавроза Лебера. В настоящем обзоре обсуждается потенциальная возможность применения генной терапии в отношении более широкого круга глазных болезней.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** сетчатка, нейропатии, дегенерация, генетические патологии, генная терапия.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Сетчатка является периферическим рецепторным отделом зрительного анализатора. Это сложно организованная нервная структура, которая воспринимает световую энергию, преобразует ее параметры в характеристики нервной импульсации, несущей соответствующую информацию, и направляет последнюю в зрительные центры головного мозга по зрительному нерву. Патологические изменения в сетчатке являются одной из основных причин плохого зрения и слепоты. Необратимые ухудшения зрения в этих случаях обусловлены снижением интенсивности обменных и восстановительных процессов, нарушениями микроциркуляции и негативными структурными изменениями в сетчатке. Патологические состояния сетчатки глаза весьма многообразны как по генезу, так и по клиническим

проявлениям. В основе таких состояний сетчатки и сосудистой оболочки глаза лежат разные по своей природе заболевания – воспалительные, наследственные, возрастные, дистрофические; в определенном смысле специфической патологией следует считать отслоение сетчатки глаза.

Благодаря своей слоистой структуре, относительно небольшому количеству типов нейронов, сравнительно легкой доступности и изолированности от других тканей сетчатка представляет собой довольно удобный объект для модельных нейробиологических исследований.

### **МОДЕЛИРОВАНИЕ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ СЕТЧАТКИ**

Экспериментальное повреждение аксонов ганглиозных клеток сетчатки широко используется в качестве модельного приема при разработке различных методик, направленных на восстановление связей в ЦНС взрослых млекопитающих [1].

---

<sup>1</sup>Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

Эл. почта: riss@biph.kiev.ua (Е. Э. Пурнынь).

К атрофии зрительного нерва приводят различные нейропатические заболевания глаза; как эффективный метод в исследованиях возможных механизмов соответствующих повреждений используется экспериментальная индукция нейропатий у животных [2, 3]. Распространенными приемами в опытах, направленных на раскрытие клеточных механизмов повреждения зрительного нерва, являются экспериментальное повышение внутриглазного давления и изменения кровоснабжения зрительного нерва [4, 5]. Показано, что степень утраты аксонов при моделировании глаукомы у мышей, крыс и обезьян коррелирует с величиной и длительностью повышения внутриглазного давления [6–12].

В многочисленных исследованиях было выявлено стимулирующее действие ряда экзогенных и эндогенных факторов на выживаемость аксотомированных ганглиозных клеток сетчатки [13]; подобные воздействия могут усиливать регенерацию аксонов таких клеток [14–16]. Обычно аксоны ганглиозных клеток сетчатки после повреждения зрительного нерва не восстанавливаются. Было показано, однако, что в культуре этот процесс можно стимулировать путем активации внутриглазных макрофагов [17]. Представлены также данные о том, что в экспериментах на крысах наложение на культуру перерезанного зрительного нерва анастомозов с периферическими нервами, содержащими в себе шванновские клетки, спасает от гибели аксотомированные ганглиозные клетки сетчатки [18, 19]. Непосредственной причиной утраты зрения при глаукоме обычно является дегенерация аксонов зрительного нерва. В данном случае нарушается аксонный транспорт, увеличивается количество глутамата и NO, а также развиваются аутоиммунные ответы [20–23].

Перерезка зрительного нерва вызывает массовую гибель ганглиозных клеток сетчатки по апоптозному сценарию как у ювенильных [24], так и у взрослых [19, 25] крыс. В соответствии с трофической теорией аксотомия (лишение связи нейронов с их мишенями) приводит к внезапному прекращению ретроградного транспорта молекул, необходимых для адекватного трофического обеспечения [26]. Согласно же альтернативной гипотезе, повреждение аксона является непосредственным фактором, который может вызвать гибель клетки. Так, резкое изменение клеточного гомеостаза и последующее нарушение ионного равновесия сопровождаются повышением утечки клеточной мембраны, в частности в результате дерегуляции кальциевого гомео-

стаза [27].

В экспериментах было показано, что введение экзогенного фактора роста нервной ткани, как и других факторов роста, может в некоторой степени препятствовать гибели ганглиозных клеток после повреждения зрительного нерва [28, 29]. Показано также, что быстрая и массовая гибель ганглиозных клеток сетчатки после аксотомии только частично связана с потерей ретроградно поступающих трофических факторов [30]. Скорость развития апоптоза ганглиозных клеток при экспериментальной глаукоме существенно возрастает [31].

Результаты, полученные с применением экспериментального моделирования различных патологических состояний глаза у животных, существенно способствовали пониманию того, как нейроны сетчатки и их аксоны реагируют на повреждение, и разработке перспективных направлений для восстановления их функций [2, 31–36]. Подробное выяснение анатомической и функциональной организации центральных зрительных путей у крыс [37] дало возможность определить топографию аксонов ганглиозных клеток при их регенерации и функциональные и поведенческие последствия пластичности нейронов. В качестве модели для изучения феномена нейропротекции Сефтон и соавт. [37] использовали зрительную систему взрослых крыс, исследуя особенности регенерации клеток зрительной системы после травмы. Полученные ими данные позволили подойти к разработке некоторых методов лечения зрительных расстройств, вызванных дегенерацией ганглиозных клеток сетчатки.

При многих заболеваниях, в том числе при глаукоме и диабете, потеря зрения является результатом в основном гибели именно ганглиозных клеток сетчатки [6–12, 20, 31, 38–41]. Показано, что увеличение уровня внутриклеточного кальция является ключевым пусковым фактором, опосредующим фатальное действие избытка возбуждающего нейротрансмиттера (глутамата) в различных центральных нейронах. Однако до настоящего времени не сложилось единого мнения о том, каким образом глутамат вызывает увеличение внутриклеточной концентрации кальция в ретинальных ганглиозных клетках. В одной из работ, посвященных глутаматергической составляющей в динамике внутриклеточного кальция и дерегуляции этого процесса в ганглиозных клетках сетчатки, особое внимание уделено механизмам эксцитотоксичности глутамата в отношении данных клеток; показана роль увеличения уровня внутриклеточного кальция и влияний NMDA-

рецепторов в гибели ганглиозных клеток [41].

Диабетическая ретинопатия (ДР) является одним из основных осложнений сахарного диабета; в 30 % случаев она приводит к абсолютной слепоте. При этом основным патогенетическим фактором является поражение капиллярного русла сетчатки. Патологические изменения, происходящие в сосудистой оболочке, вызывают возникновение зон инфарктов в сетчатке, в которых погибают во всяком случае значительная часть нервных клеток. Результаты исследований по выяснению причинно-следственных связей между гипергликемией, вызываемым ею оксидативным стрессом и развитием ДР показали, что при гипергликемии или диабете метаболизм глюкозы и нижний уровень гексокиназы в сетчатке не претерпевают драматических изменений [42]. Таким образом, молекулярные механизмы патологических изменений в данной структуре пока остаются не вполне понятными [43]. Метаболизм глюкозы в сетчатке начинается с инсулинзависимого транспорта глюкозы через гемато-ретиальный барьер [44]. Развитие повреждений сетчатки, вызванных диабетом, коррелирует с избыточным уровнем глюкозы в циркуляторном русле, но пока не ясно, связан ли эффект только с токсическим действием гипергликемии, или же более значительную роль играет вклад неадекватной сигнализации от инсулиновых рецепторов [45]. Биохимические нарушения, связанные с гипергликемией и обнаруженные в сетчатке в условиях диабета, включают в себя активирование протеинкиназы С [46], увеличение интенсивности синтеза гексозамина [47] и активацию факторов роста, что способствует развитию апоптоза [48]. После того, как было обнаружено регуляторное влияние индуцибельной NO-синтазы на оксигенацию сетчатки при экспериментальном диабете, логичным стало предположение о заметной роли NO в патогенезе ДР [49]. Были получены новые данные, которые касаются нитрования тирозина и потенциальной роли этого процесса в молекулярных механизмах, обуславливающих развитие ДР [50]. Долгое время ДР считали “чисто сосудистым” заболеванием. Теперь же стало известно, что нейроны сетчатки при диабете также повреждаются, причем развивается и дегенерация клеток ряда других типов. Лучшее всего изучены в этом отношении ганглиозные клетки сетчатки [51].

За последние годы было достигнуто более глубокое понимание молекулярных механизмов, которые лежат в основе глазных болезней, приводящих к слепоте. К их числу относятся уже упомянутые

глаукома, ДР, а также возрастная макулодистрофия, пигментный ретинит (*retinitis pigmentosa*) и др. Приобретенная или унаследованная дегенерация сетчатки является основной причиной ослабления зрения и слепоты у человека. Наследственная дегенерация сетчатки соответствует значительной группе отличающихся друг от друга заболеваний, общим результатом которых является гибель фоторецепторов. Уже идентифицировано и выделено значительное количество генов, связанных с развитием данной патологии [52].

При глаукомной оптической нейропатии поражается зрительный нерв, а пигментный ретинит вызывает дегенерацию фоторецепторных клеток сетчатки, тогда как влажная возрастная макулодистрофия и ДР связаны преимущественно с аномальным ангиогенезом. Развитие новых кровеносных сосудов может приводить к нежелательным патологическим изменениям васкуляризации и драматическим повреждениям сетчатки [53].

На основании результатов исследований *in vitro* и изучения случаев наследственной глаукомы в модельных экспериментах на мышцах Уитмор и соавт. [54] отметили, что в основе деструкции сом и аксонов ганглиозных клеток сетчатки лежат различные дегенерационные молекулярно-метаболические процессы. В данной работе внимание было сфокусировано на повреждениях ганглиозных клеток сетчатки и центральных зрительных путей, а также на успехах восстанавливающей терапии.

В научной литературе уже появились публикации с описанием методов клеточной трансплантации, т.е. попыток заменить утраченные ганглиозные клетки сетчатки или поддержать возобновление роста их аксонов по направлению к зрительным центрам мозга через внешние нервные мостики [18, 19]. На двух различных моделях дегенерации сетчатки у крыс Арман и Сейлер [33] показали возможность трансплантации как диссоциированных клеток сетчатки, так и имплантатов интактной ретиальной донорской ткани; регистрация ожидаемых эффектов производилась в участках *colliculus superior*, соответствующих месту расположения трансплантата в сетчатке.

Обнаружилось, что стволовые клетки достаточно хорошо интегрируются в сетчатку и демонстрируют способность к дифференциации, трансформируясь в клетки пигментного эпителия, ганглиозные клетки, фоторецепторы и глиоциты [53].

Получены свидетельства того, что дегенерация фоторецепторов может быть замедлена с по-

мощью внутриглазных инъекций факторов роста/выживаемости или антиапоптозных факторов [35, 36, 55]. Хотя внутриглазные инъекции трофических факторов, полученных с помощью различных рекомбинантных методик, увеличивают индекс выживаемости ганглиозных клеток сетчатки после повреждения зрительного нерва, введение подобных факторов в ударных дозах в зрелую сетчатку обеспечивает только временную защиту упомянутых клеток [28–30, 55, 56]. По мнению ряда авторов, интравитреальная имплантация клеток или тканей, секретирующих факторы роста, может оказывать негативные влияния на ткани глаза, не обеспечивая восстановления зрения [57, 58]. Следует отметить, что в экспериментах сейчас начали применять комплексные методики лечения с использованием не применявшихся ранее комбинаций трансплантации, фармакотерапии и генной терапии [34, 57].

## ПОПЫТКИ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ПАТОЛОГИЯХ СЕТЧАТКИ

Большое разнообразие генетических заболеваний глаз связано с тем, что развитие и функционирование органа зрения зависят от координированных влияний множества генов, любой из которых в определенных случаях может функционировать неадекватно. Генные патологии могут либо обуславливаться нарушением функции только глаза, либо иметь многофакторную природу.

Достижения молекулярной биологии последних лет подготовили возможность создания новых методов терапии различных зрительных расстройств с учетом молекулярных, клеточных и генных механизмов последних; соответствующая информация приведена в обзоре Лю и соавт. [53]. Описаны результаты экспериментальных работ в области клеточной и тканевой терапии, использования пептидов и генной терапии для лечения некоторых глазных болезней, а также рассмотрены достижения в разработке различных систем адресной доставки соответствующих лечебных средств к сетчатке. Полученные данные в дальнейшем могут стать основой для создания новых надежных и продолжительно действующих методов лечения. Пока, однако, ни один из приемов доставки генов к сетчатке (использование вирусных векторов, невирусные методики) не удовлетворяет всем критериям “идеальной” геннотерапевтической системы (этот аспект подробно рассмотрен в ряде работ, указан-

ных в упомянутом обзоре [53]).

Морфоанатомическое строение глаза в принципе позволяет доставлять соответствующие генные реагенты адресно, что улучшает перспективы исправления генетических дефектов органа зрения с помощью методов генной инженерии [59, 60]. Соответствующие методы широко применяются в экспериментальных исследованиях, направленных на обеспечение сохранности фоторецепторов; при этом используются различные модели острых и хронических глазных болезней. На грызунах и собаках было показано, что приемы генной терапии позволяют замедлить утрату фоторецепторов, однако эффективная передача генного материала к клеткам других типов, в частности к ганглиозным клеткам сетчатки, остается более проблематичной [60, 61]. Возрастающее количество исследований ориентированы на обеспечение длительной нейропротекции и стимуляцию регенеративных процессов. При этом используются вирусные переносчики или другие методы трансфекции для генной модификации самих ганглиозных клеток либо поддерживающих клеток глаза, таких как глиальные клетки Мюллера [60–62]. Использование животных, имеющих определенную офтальмологическую патологию, в качестве моделей конкретных заболеваний человека позволяет подойти к пониманию основных закономерностей, наблюдаемых в клинике, и опробовать в эксперименте способы коррекции таких патологий. Сведения о модельных подходах к изучению некоторых глазных болезней человека, таких как ретинопатия недоношенных (*retinopathy prematurity*), врожденная слепота (амавроз) Лебера (*Leber congenital amaurosis – LCA*), мукополисахаридоз (*mucopolysaccharidosis*), ретинобластома (*retinoblastoma*), пигментный ретинит и ДР, уже упомянутые выше, а также глаукома и возрастная макулярная дегенерация (*age-related macular degeneration*), приведены в обзоре Беннетта и соавт. [63].

Наследственные болезни принято разделять на три группы – хромосомные, моногенные и мультифакториальные, различающиеся по механизму наследования. Собственно наследственные моногенные заболевания наследуются в соответствии с законами Менделя. Хромосомные болезни обусловлены изменением структуры и числа хромосом. В основе моногенных болезней лежат мутации отдельных генов (доминантных и рецессивных); многие врожденные пороки развития обусловлены полигенным наследованием. В возникновении

и развитии мультифакториальных заболеваний, или полигенных болезней, существенную роль играют как генетические факторы (мутации или сочетания аллелей), так и факторы внешней среды. К мультифакториальным заболеваниям относятся такие широко распространенные патологии, как сахарный диабет, гипертоническая болезнь, коронарная болезнь, бронхиальная астма, шизофрения и ряд других. Они являются результатом сложного взаимодействия генетических факторов и факторов среды, причем и те и другие могут быть достаточно многочисленными [64].

В 1990 г. впервые была обнаружена генная мутация, вызывающая пигментную дегенерацию сетчатки. К концу 2004 г. были идентифицированы уже более чем 100 генов и 155 хромосомных локусов, мутации которых приводят к дегенеративным изменениям сетчатки [65]. Кроме того, были идентифицированы приблизительно 300 изменений митохондриальной ДНК, которые вызывают заболевания генно-митохондриального происхождения. Понятие “митохондриальные болезни” (или митохондриальные цитопатии) сформировалось в конце XX в. благодаря открытым незадолго до этого наследственным заболеваниям, основными этиопатогенетическими факторами которых являются мутации генов митохондриальной ДНК, ответственных за синтез митохондриальных белков. Поскольку митохондрии в клетках организма имеют исключительно материнское происхождение, передача болезни митохондриального генеза по мужской линии невозможна. Сыновья же и дочери больной матери поражаются в равной степени. Следует подчеркнуть, что в случае патологий, связанных с изменениями митохондриальной ДНК, наблюдается неменделевский тип наследования, определяемый как цитоплазматический, или неядерный. Оптические нейропатии, связанные с митохондриальной дисфункцией, рассматриваются в обзоре Коррал-Дебрински и Сахеля [66]. Так, врожденная оптическая нейропатия Лебера (*Leber hereditary optic neuropathy – LHON*) и доминантная оптическая атрофия (*dominant optic atrophy – DOA*) являются несиндромными зрительными нейропатиями с митохондриальной этиологией. LHON связана с точечными мутациями в геноме митохондрий. Эта патология обуславливает избирательную гибель ганглиозных клеток сетчатки и атрофию зрительного нерва, в результате чего происходит потеря центрального зрения (преимущественно у молодых мужчин). Симптомы проявляются обычно в возрас-

те 15–35 лет. Клеточные и молекулярные механизмы гибели ганглиозных клеток сетчатки, вызываемые этой митохондриальной дисфункцией, пока не определены [66].

Геномные исследования и идентификация генов, повреждение которых приводит к тем или иным заболеваниям, позволяют глубже понять биохимические процессы, определяющие тонкие механизмы формирования клинических проявлений болезни. Эти новые знания могут служить основой для разработки адекватных методов лечения, в том числе генной терапии – этиологически ориентированной коррекции наследственных болезней. Одним из преимуществ соответствующих методик по сравнению с другими методами лечения является то, что после введения генного материала “недостающие” молекулы продуцируются внутри самой ткани-мишени в большом количестве и в течение длительного периода времени. Понятно, что стабильный терапевтический эффект однократного введения упомянутого материала более желателен, чем достигаемый в случае необходимости множественных инъекций. При генной терапии наследственных офтальмологических заболеваний ряд существенных особенностей аденоассоциированных вирусных переносчиков (AAV) и аденовирусов (Ad) делают их перспективными носителями для доставки генов в глаз. В частности, обладая незначительной патогенностью, такие носители могут быть использованы для длительной трансфекции ретинальных клеток. Оптимальные методы доставки генов с помощью переносчиков определяются расположением и характеристиками клеток-мишеней [60–63].

Суть генной терапии, обеспечивающей терапевтический эффект, заключается в доставке нового генетического материала в клетки-мишени индивида. Генную терапию можно рассматривать как принципиально новый способ воздействия терапевтических агентов на организм, поскольку она обеспечивает стимуляцию синтеза определенных веществ, необходимых для терапии того или иного заболевания, собственными клетками организма реципиента. Клетки животных и человека способны поглощать экзогенную ДНК и встраивать ее в свой геном (трансфекция эукариотических клеток как метод генной инженерии), после чего реализуется экспрессия введенных генов – синтез отсутствовавших ранее белков, в частности ферментов. В настоящее время в экспериментах используют различные методы переноса генов, в том числе прямую инъекцию в ткань субстанции, содержащей в себе

“голый” ген, кальций-фосфатную трансфекцию, перенос с помощью липосом, физические приемы – электропорацию, перенос ультразвуком и др., перенос генов с помощью ретровирусов или других вирусных векторов, прицельную доставку генов в клетки определенного типа с задействованием рецепторов этих клеток и некоторые другие методы [53, 61, 67–71]. В эксперименте было показано, что компактные ДНК-содержащие наночастицы могут эффективно и безопасно обеспечивать экспрессию новых генов как в митотических, так и в постмитотических фоторецепторах и замедлять у мышей дегенерацию сетчатки при пигментном ретините (наследственном заболевании, характеризующемся последовательным разрушением палочек и колбочек сетчатки) [72].

## КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

Концепция генной терапии существует лишь на протяжении последних десятилетий и пока что находится на начальном этапе развития. Современные исследования в области генной терапии включают в себя ряд относительно независимых этапов – разработку генных конструкций, проведение доклинических испытаний на экспериментальных животных и, наконец, проведение прямых клинических исследований эффективности лечения определенных заболеваний у человека.

Генная терапия – это раздел молекулярной медицины, основанный на введении корректной копии гена в соматическую клетку с целью излечения заболевания или же стабилизации/улучшения клинической картины последнего [71]. Как отмечалось на Первом межотраслевом международном симпозиуме, посвященном клинике и лечению наследственных заболеваний сетчатки (First International Symposium on Translational Clinical Research for Inherited and Orphan Retinal Diseases, декабрь 2004 г.), фундаментальная наука сформировала соответствующий базис для развития прикладной медицины, направленной на лечение некоторых глазных патологий, и уже есть определенные основания для оптимизма [73]. Во введении к своему обзору, посвященному прогрессу и перспективам клинических исследований с использованием генной терапии [74], Алтон отмечает, что за два десятилетия генная терапия перешла от доклинических экспериментальных к клиническим исследованиям в области лечения ряда заболеваний, начиная

от болезней, вызванных изменениями одного гена (муковисцидоз – *cystic fibrosis* – и мышечная дистрофия Дюшена – *Duchenne muscular dystrophy*), и переходя к более сложным патологиям, таким как рак и сердечно-сосудистые заболевания. Что же касается офтальмологических заболеваний, то две независимые группы исследователей реализовали первую фазу клинических испытаний применимости генной терапии в отношении наследственных глазных болезней [75]. В 2006 г. были опубликованы результаты успешно проведенной начальной фазы клинических испытаний на людях, страдающих неоваскулярной формой возрастной макулярной дегенерации (*age-related macular degeneration – AMD*) [76]. Хориоидальная неоваскуляризация – патология, обнаруженная при данном заболевании, – приводит к повреждению сетчатки и слепоте. Одноразовая инъекция аденовирусного вектора (Ad5), обеспечивающего синтез PEDF (*human pigment epithelium-derived factor*) – эндогенного протеина, полностью или частично предотвращающего развитие патологической неоваскуляризации, – была произведена 28 испытуемым. Следует отметить, что способность PEDF угнетать неоваскуляризацию сетчатки сначала была продемонстрирована в модельных экспериментах на животных (при этом использовались как AAV-, так и Ad-векторы).

Восьми пациентам с ретинобластомой, которым не помогла стандартная терапия, в новообразование в стекловидном теле также одноразово был введен Ad-вектор, направляющий ген тимидинкиназы простого вируса герпеса [77]. По мнению Беннета [59], устойчивость терапевтического эффекта после одноразовых инъекций в упомянутых выше случаях клинических испытаний применения генной терапии является обнадеживающим фактом, а безопасность в отношении вероятных иммунных реакций, связанных с лечением, предстоит оценить в дальнейшем. В целом токсичность после интраокулярного введения Ad-векторов оказалась минимальной [59]. Следует, однако, указать, что Ad-векторы не являются средством выбора при лечении многих глазных болезней, поскольку они не всегда четко ориентированы на клетки, связанные с заболеванием. Например, Ad5-вектор не нацелен строго на фоторецепторы или ганглиозные клетки; таким образом, он вряд ли будет эффективным в лечении ретинальных дегенеративных заболеваний или заболеваний, вызывающих атрофию ганглиозных клеток (глаукома) [59].

Следующим заболеванием, которое начали ис-

следовать в клинических испытаниях генной терапии на людях, стало аутосомно-рецессивное дегенеративное заболевание сетчатки – наследственный амавроз Лебера (Leber's congenital amaurosis – LCA) [59]. Этим термином характеризуют группу наследственных дистрофий сетчатки, симптоматически проявляющихся в раннем детстве и приводящих к абсолютной слепоте в зрелом возрасте. Коенкооп и соавт. [78] рассмотрели смену парадигмы в понимании генетической основы данного заболевания и перспективы его лечения в будущем. В основе некоторых форм аутосомной детской слепоты у человека, включая LCA, лежат мутации гена *RPE65* (гена пигментного эпителия). В экспериментах на мышах было показано, что, используя методы генной терапии, можно восстановить нормальное зависимое от зрения поведение у слепых от рождения животных [79]. Результаты контрольных проверочных экспериментов на собаках с мутацией данного гена, в которых пытались восстановить зрительную функцию путем субретинального введения комплементарной ДНК с *RPE65* с помощью AAV-переносчика показали, что зрительная функция после однократного лечения возвращалась и оставалась стабильной в течение почти восьми лет [80].

После таких успехов в опытах на животных две независимые научные группы опубликовали результаты первой фазы клинических испытаний на взрослых людях с развитой стадией упомянутого заболевания [81, 82]. Гензаместительная терапия для лечения LCA была проведена с использованием двух специальных протоколов в общей сложности у шести пациентов с LCA, вызванным дефектом гена *RPE65*. Обе группы сообщили об улучшении субъективных показателей остроты зрения у испытуемых, однако параметры ретинограмм через пять и 12 месяцев не нормализовались. Одна из групп исследователей [82] отметила небольшое улучшение зрительной активности и усиление реакций зрачка на свет, а также тенденцию к расширению поля зрения, тогда как вторая группа [81] обнаружила у пациента с лучшей исходной зрительной функцией статистически значимое улучшение показателей результатов периметрии в условиях адаптации к темноте. Несмотря на то что способность к чтению не восстановилась ни у одного из пациентов, результаты своих исследований авторы оценили как весьма оптимистичные. Было показано, что техника генной терапии как таковая вполне выполнима и данный метод лечения может привести к улучшению зрительных функций даже на относительно поздней

стадии заболевания [83]. У пациентов 21–24 лет, страдающих с детства сильными расстройствами зрения из-за LCA, заместительная генная терапия (инъекция *RPE65* с помощью AAV-переносчика в один глаз в область между слоем пигментного эпителия сетчатки и слоем фоторецепторов) сопровождалась существенным, хотя и неполным восстановлением зрения [84].

Кроме того, 12 пациентам восьми–44 лет с обусловленным дефектностью *RPE65* LCA однократно в больной глаз были введены различные количества AAV с геном, который кодирует протеин, обеспечивающий изомерогидролазную активность в пигментном эпителии сетчатки (AAV2-*hRPE65v2*). Пациенты хорошо перенесли инъекцию; через два года у них наблюдалось значительное улучшение субъективных и объективных показателей зрения. Результат в данном случае в значительной степени зависел от возраста пациентов [85]. Осталось, однако, невыясненным, будут ли безопасными и эффективными подобные манипуляции со вторым глазом или же это приведет к осложнению (развитию иммунного ответа) после первой инъекции. В связи с этим авторам пришлось вернуться к модельным экспериментам на животных [86]. Оценка иммунологических и функциональных последствий повторного субретинального введения гAAV2-*hRPE65v2* во второй глаз показала, что только у одного из 10 животных проявился стойкий иммунный ответ, обусловленный реакцией Т-клеток определенного типа на AAV2. В целом же вмешательство на втором глазе оказалось относительно безопасным и эффективным даже при наличии иммунного ответа на вектор AAV2 [86].

Следует заметить, что в данном аспекте, естественно, требуется наблюдение за большими группами людей для установления продолжительности терапевтического эффекта, а также вероятности осложнений, связанных с этой формой генной терапии. Описанные выше исследования заложили основу безопасной коррекции (“proof-of-principle”) наследственных заболеваний сетчатки и определили направление развития методов генной терапии в отношении широкого круга глазных болезней [83]. Последующие исследования, возможно, ориентируют потенциал генной терапии на формы LCA, которые вызваны мутациями в генах, отличных от *RPE65*. Однако Коенкооп и соавт. [78] акцентировали необходимость осторожности при экстраполяции успеха генной терапии на все формы LCA, прогнозируя, однако, что через 10 лет по крайней мере 50 % детей с LCA смогут получить ген-

заместительную терапию.

Цветовая слепота (как правило, наследственная, реже – приобретённая особенность зрения у человека и других приматов) выражается в неспособности различать один или несколько цветов. Различные формы цветовой слепоты возникают в результате потери или модификации одного или более колбочковых пигментов (опсинов). Манкузо и соавт. [87] представили данные о восстановлении у двух обезьян-дихроматов трихроматического цветового зрения после доставки с помощью AAV гена недостающего (третьего) зрительного пигмента к их фоторецепторам. Следует отметить, что трихроматическое зрение эти животные сохраняли более двух лет. То, что была обнаружена принципиальная возможность перепрограммирования “старых” нейронных объединений на передачу новых зрительных сигналов, открывает перспективы воздействия на такие патологические состояния, как полная ахроматопсия, колбочко-палочковая дистрофия и некоторые макулопатии. По мнению Беннета [88], в дальнейшем будет возможно не только восстанавливать функцию пораженных колбочек (получать цветовые зрительные образы), но и предохранять эти клетки от гибели.

Хотя новые данные, которые получены с применением методов молекулярной генетики в отношении биологических процессов, ответственных за цветовое зрение, весьма существенны, наше понимание указанных процессов остается далеко не полным. Указанному аспекту посвящен один из обзоров [89]. Проводимые в настоящее время клинические применения генной терапии фактически являются начальной стадией испытаний этого метода с участием ограниченного числа пациентов. Надо полагать, что дальнейшие исследования помогут определить достоинства генной терапии при различных формах LCA и других наследуемых нейродегенеративных изменениях сетчатки митохондриальной этиологии, а также ряде генетических и приобретенных заболеваний глаза [53, 63, 75, 78–88]. Обязательным условием возможности применения данного метода является наличие достаточно полной информации о патогенезе заболевания, которое собираются лечить с помощью генной терапии, и по крайней мере о его отдельных звеньях, относящихся к генконтролируемым и одновременно играющим критически важную роль в процессе развития заболевания. Специфика строения сетчатки открывает уникальные возможности для исследования адресной доставки терапевтиче-

ского генетического материала, что повышает вероятность успешного исправления генетических дефектов глаза с использованием методов генной инженерии [95–97]. Естественно, успехи первой фазы клинических испытаний [85, 90] и продолжающихся модельных экспериментов [87, 91–93] не исключают необходимости дальнейшего подтверждения эффективности данного способа терапии.

Поскольку по такому показателю, как частота генетических нарушений, глаз уступает только мозгу [98], разработка стратегий генной терапии заболеваний органа зрения является весьма актуальной. Показано, что генная терапия слепоты, связанной с мутацией *RPE65*, безопасна и обуславливает улучшение зрения по крайней мере на три года, однако прогрессирование дегенерации фоторецепторов в данном случае не ослабевает. Поэтому, видимо, целесообразна комбинированная стратегия лечения LCA – сочетание генной терапии с мерами, замедляющими дегенерацию сетчатки [99]. Как упоминалось выше, в последние годы были достигнуты значительные успехи в развитии геннотерапевтических подходов в лечении дегенерации сетчатки. Именно данные клинических испытаний генной терапии заболеваний сетчатки человека показали, что AAV-вектор относительно безопасен и весьма эффективен при лечении дегенерации сетчатки и что такая терапия в перспективе может помочь предотвратить или отсрочить развитие слепоты [100]. Недавно было показано, что индукция экспрессии родопсина человека в сетчатке мышей с генетически обусловленной слепотой, выполненная с использованием методов вирусной генной терапии, может обеспечивать восстановление у таких животных чувствительности к свету и частично – зрения [101]. Безусловно, успехи разработки безопасных методов лечения сложных генетических заболеваний сетчатки для восстановления зрения обнадеживают всех, кто в ней нуждается. При этом, однако, не следует забывать и о существовании альтернативных методов восстановления зрения, также основанных на передовых технологиях (как, например, применение протезов сетчатки, в частности Argus II System, известного под названием “бионический глаз” [102]).

Настоящая работа имеет обзорный характер и не была связана с какими-либо исследованиями на людях или животных; подтверждение соответствия публикации этическим нормам в данном случае не требуется.

Автор данной работы – Е. Э. Пурнинь – подтверждает отсутствие конфликтов любого рода, касающихся коммерческих или финансовых вопросов и отношений с организациями или лицами, которые каким-либо образом могли быть связаны с работой.

О. Е. Пурнинь<sup>1</sup>

#### МОЖЛИВОСТІ КОРЕКЦІЇ ПАТОЛОГІЧНИХ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИХ ЗМІН СІТКІВКИ ССАВЦІВ

<sup>1</sup>Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

#### Резюме

Сітківка – периферична ланка зорового аналізатора – є складною системою, від адекватного функціонування якої залежить зір. Втрата якогось типу клітин сітківки внаслідок будь-якого захворювання або травми руйнує складні нейронні ланцюги, котрі відіграють найважливішу роль у забезпеченні зорової функції. Для розкриття механізмів, що лежать в основі різних патологічних процесів у сітківці, зумовлюючих у людини спадкову або надбану втрату зору, використовують моделювання відповідних патологічних станів в експериментах на лабораторних тваринах. Досягнення молекулярної та клітинної біології забезпечили істотний прогрес у створенні нових методів терапії різних розладів зору. У літературі вже описані методики нейротрофічної та генної терапії, які застосовують в експерименті. Успішне використання методів генної терапії на лабораторних тваринах дозволило перейти до першої фази клінічних досліджень при спробах лікування ретинобластоми, вікової макулярної дегенерації та вродженого амаврозу Лебера. В даному огляді обговорюється потенційна можливість застосування генної терапії щодо більш широкої низки захворювань ока.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. Chierzi and J. W. Fawcett, "Regeneration in the mammalian optic nerve," *Restorat. Neurol. Neurosci.*, **19**, Nos. 1/2, 109-118 (2001).
2. J. C. Morrison, E. C. Johnson, and W. Cepurna, "Animal models in glaucoma research," *Ophthalmic Pract.*, **16**, 12-20 (1998).
3. F. Mabuchi, M. Aihara, J. D. Lindsey, and R. N. Weinreb, "Experimental mouse ocular hypertension: establishment of the model," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**, 4314-4320 (2003).
4. S. Orgul, G. A. Cioffi, D. L. Wilson, and E. M. Van Buskirk, "An endothelin-1 induced model of optic nerve ischemia in the rabbit," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **37**, 1860-1869 (1996).
5. R. L. Radius and J. E. Pederson, "Laser-induced primate glaucoma, II: histopathology," *Arch. Ophthalmol.*, **102**, 1693-1698 (1984).
6. F. Mabuchi, M. Aihara, R. M. Mackey, et al., "Optic nerve

- damage in experimental mouse ocular hypertension," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**, 4321-4330 (2003).
7. S. D. Grozdanic, D. M. Betts, D. S. Sakaguchi, et al., "Laser-induced mouse model of chronic ocular hypertension," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**, 4337-4346 (2003).
8. J. Danias, K. C. Lee, M. F. Zamora, et al., "Quantitative analysis of retinal ganglion cell (RGC) loss in aging DBA/2NNia glaucomatous mice: comparison with RGC loss in aging C57/BL6 mice," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**, 5151-5162 (2003).
9. R. L. Gross, J. Ji, P. Chang, et al., "A mouse model of elevated intraocular pressure: retina and optic nerve findings," *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, **101**, 163-169 (2003).
10. J. E. Pederson and D. E. Gaasterland, "Laser-induced primate glaucoma. I. Progression of cupping," *Arch. Ophthalmol.*, **102**, 1689-1692 (1984).
11. S. Laquis, P. Chaudhary, and S. C. Sharma, "The patterns of retinal ganglion cell death in hypertensive eyes," *Brain Res.*, **784**, 100-104 (1998).
12. E. C. Johnson, L. M. Deppmeier, S. K. Wentzien, et al., "Chronology of optic nerve head and retinal responses to elevated intraocular pressure," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, 431-442 (2000).
13. H. K. Yip and K. F. So, "Axonal regeneration of retinal ganglion cells: effect of trophic factors," *Prog. Retin. Eye Res.*, **19**, 559-575 (2000).
14. Q. Cui, Q. Lu, K. F. So, and H. K. Yip, "CNTF, not other trophic factors, promotes axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult hamsters," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **40**, 760-766 (1999).
15. S. Leon, Y. Yin, J. Nguyen, et al., "Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve," *J. Neurosci.*, **20**, No. 12, 4615-4626 (2000).
16. D. Fischer, P. Heiduschka, and S. Thanos, "Lens-injury-stimulated axonal regeneration throughout the optic pathway of adult rats," *Exp. Neurol.*, **172**, 257-272 (2001).
17. Y. Li, N. Irwin, Y. Yin, et al., "Axon regeneration in goldfish and rat retinal ganglion cells: Differential responsiveness to carbohydrates and cAMP," *J. Neurosci.*, **23**, No. 21, 7830-7838 (2003).
18. M. P. Villegas-Perez, M. Vidal-Sanz, M. Rasminsky, et al., "Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats," *J. Neurobiol.*, **24**, 23-36 (1993).
19. M. Berkelaar, D. B. Clarke, Y. C. Wang, et al., "Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats," *J. Neurosci.*, **14**, 4368-4374 (1994).
20. R. W. Nickells, "Retinal ganglion cell death in glaucoma: the how, the why, and the maybe," *J. Glaucoma*, **5**, 345-356 (1996).
21. R. N. Weinreb and L. A. Levin, "Is neuroprotection a viable therapy for glaucoma?" *Arch. Ophthalmol.*, **117**, 1540-1544 (1999).
22. L. Carter-Dawson, M. L. Crawford, R. S. Harwerth, et al., "Vitreous glutamate concentration in monkeys with experimental glaucoma," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **43**, 2633-2637 (2002).
23. S. Bakalash, J. Kipnis, E. Yoles, and M. Schwartz, "Resistance of retinal ganglion cells to an increase in intraocular pressure is immunodependent," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **43**, 2648-2653 (2002).
24. S. A. Rabacchi, L. Bonfanti, X.-H. Liu, and L. Maffei,

- “Apoptotic cell death induced by optic nerve lesion in the neonatal rat,” *J. Neurosci.*, **14**, No. 9, 5292-5301 (1994).
25. E. Garcia-Valenzuela, W. Gorczyca, Z. Darzynkiewicz, and S. C. Sharma, “Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy,” *J. Neurobiol.*, **25**, 431-438 (1994).
  26. E. M. Johnson and T. L. Deckwerth, “Molecular mechanisms of developmental neuronal death,” *Annu. Rev. Neurosci.*, **16**, 31-46 (1993).
  27. D. W. Choi, “Excitotoxic cell death,” *J. Neurobiol.*, **23**, 1261-1276 (1992).
  28. S. A. Rabacchi, M. Ensini, L. Bonfanti, et al., “Nerve growth factor reduces apoptosis of axotomized retinal ganglion cells in the neonatal rat,” *Neuroscience*, **63**, Iss. 4, 969-973 (1994).
  29. A. Cohen, G. M. Bray, and A. J. Aguayo, “Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) increases adult rat retinal ganglion cells survival and neurite outgrowth *in vitro*,” *J. Neurobiol.*, **25**, 953-959 (1994).
  30. M. Fagiolini, M. Caleo, E. Strettoi, and L. Maffei, “Axonal transport blockade in the neonatal rat optic nerve induces limited retinal ganglion cell death,” *J. Neurosci.*, **17**, No. 18, 7045-7052 (1997).
  31. H. A. Quigley, R. W. Nickells, L. A. Kerrigan, et al., “Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **36**, 774-786 (1995).
  32. S. W. John, J. V. Harber, J. Y. Fingert, and M. G. Anderson, “Animal models of exfoliation syndrome, now and future,” *J. Glaucoma*, **23**, Iss. 8, Suppl. 1, S68-S72 (2014).
  33. R. B. Aramant and M. J. Seiler, “Retinal transplantation-advantages of intact fetal sheets,” *Prog. Retin. Eye Res.*, **21**, Iss. 1, 57-73 (2002).
  34. A. R. Harvey, Y. Hua, S. G. Leavera, et al., “Gene therapy and transplantation in CNS repair: The visual system,” *Prog. Retin. Eye Res.*, **25**, 449-489 (2006).
  35. E. Chaum, “Retinal neuroprotection by growth factors: a mechanistic perspective,” *J. Cell Biochem.*, **88**, 57-75 (2003).
  36. A. Wenzel, C. Grimm, M. Samardzija, and C. E. Remer, “Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration,” *Prog. Retin. Eye Res.*, **24**, 275-306 (2005).
  37. A. J. Sefton, B. Dreher, and A. R. Harvey, “Visual system,” in: *The Rat Nervous System*, G. Paxinos (ed.), Acad. Press, San Diego (2004), pp. 1083-1165.
  38. A. J. Barber, “A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye,” *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.*, **27**, 283-290 (2003).
  39. N. N. Osborne, J. Melena, G. Chidlow, and J. P. M. Wood, “A hypothesis to explain ganglion cell death caused by vascular insults at the optic nerve head: possible implications for the treatment of glaucoma,” *Br. J. Ophthalmol.*, **85**, 1252-1259 (2001).
  40. N. N. Osborne, G. Chidlow, C. J. Layton, et al., “Optic nerve and neuroprotection strategies,” *Eye*, **18**, 1075-1084 (2004).
  41. A. T. E. Hartwick, C. M. Yamilton, and W. H. Baldrige, “Glutamatergic calcium dynamics and deregulation of rat retinal ganglion cells,” *J. Physiol.*, **586**, 3425-3446 (2008).
  42. M. Sh. Ola, D. A. Berkich, Y. Xu, et al., “Analysis of glucose metabolism in diabetic rat retinas,” *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **290**, E1057-E1067 (2006).
  43. N. Toda and M. Nakanishi-Toda, “Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy,” *Prog. Retin. Eye Res.*, **26**, 205-238 (2007).
  44. A. Ceriello, “New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a “causal” antioxidant therapy,” *Diabetes Care*, **26**, 1589-1596 (2003).
  45. T. W. Gardner, D. A. Antonetti, A. J. Barber, et al., “Diabetic retinopathy: more than meets the eye,” *Surv. Ophthalmol.*, **47**, Suppl. 2, S253-S262 (2002).
  46. D. Koya and G. L. King, “Protein kinase C activation and the development of diabetic complications,” *Diabetes*, **47**, 859-866 (1998).
  47. H. Heath, R. A. Paterson, and J. C. Hart, “Changes in the hydroxyproline, hexosamine and sialic acid of the diabetic human and beta, beta'-iminodipropionitrile- treated rat retinal vascular systems,” *Diabetologia*, **3**, 515-518 (1967).
  48. M. Nakamura, A. J. Barber, D. A. Antonetti, et al., “Excessive hexosamines block the neuroprotective effect of insulin and induce apoptosis in retinal neurons,” *J. Biol. Chem.*, **276**, 43748-43755 (2001).
  49. B. A. Berkowitz, H. Luan, R. R. Gupta, et al., “Regulation of the early subnormal retinal oxygenation response in experimental diabetes by inducible nitric oxide synthase,” *Diabetes*, **53**, 173-178 (2004).
  50. X. Zhan, Y. Du, and J. S. Crabb, “Targets of tyrosine nitration in diabetic rat retina,” *Mol. Cell. Proteomics*, **7**, 864-874 (2008).
  51. A. J. Barber, “A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye,” *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.*, **27**, 283-290 (2003).
  52. S. Lev, “Molecular aspects of retinal degenerative diseases,” *Cell. Mol. Neurobiol.*, **21**, No. 6, 575-589 (2001).
  53. X. Liu, C. R. Brandt, C. A. Rasmussen, et al., “Ocular drug delivery: molecules, cells, and genes,” *Can. J. Ophthalmol.*, **42**, 447-454, (2007).
  54. A. V. Whitmore, R. T. Libby, and S. W. John, “Glaucoma: thinking in new ways—a role for autonomous axonal self-destruction and other compartmentalised processes?” *Prog. Retin. Eye Res.*, **24**, 639-662 (2005).
  55. D. B. Clarke, G. M. Bray, and A. J. Aguayo, “Prolonged administration of NT-4/5 fails to rescue most axotomized retinal ganglion cells in adult rats,” *Vis. Res.*, **38**, 1517-1524 (1998).
  56. S. Isenmann, A. Kretz, and A. Cellerino, “Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival, and regeneration,” *Prog. Retin. Eye Res.*, **22**, 483-543 (2003).
  57. P. Lu, H. Yang, L. L. Jones, et al., “Combinatorial therapy with neurotrophins and cAMP promotes axonal regeneration beyond sites of spinal cord injury,” *J. Neurosci.*, **24**, 6402-6409 (2004).
  58. G. Le Meur, M. Weber, Y. Pereon, et al., “Postsurgical assessment and long-term safety of recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer into the retinas of dogs and primates,” *Arch. Ophthalmol.*, **123**, 500-506 (2005).
  59. J. Bennett, “An eye for gene therapy,” *Human Gene Ther.*, **17**, 177-179 (2006).
  60. K. R. Martin and H. A. Quigley, “Gene therapy for optic nerve disease,” *Eye*, **18**, 1049-1055 (2004).
  61. K. R. Martin, R. L. Klein, and H. A. Quigley, “Gene delivery to the eye using adeno-associated viral vectors,” *Methods*, **28**, 267-275 (2002).
  62. K. R. Martin, H. A. Quigley, D. J. Zack, et al., “Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**, 4357-4365 (2003).
  63. N. S. Dejneka, T. S. Rex, and J. Bennett, “Gene therapy

- and animal models for retinal disease,” in: *Genetics in Ophthalmology, Dev. Ophthalmol.*, Vol. 37, B. Wissinger, S. Kohl, and U. Langenbeck (eds.), Karger, Basel (2003), pp. 188-198.
64. Н. П. Дубинин, Ю. В. Пашин, *Мутагенез и окружающая среда*, Наука, Москва (1978).
  65. G. J. Chader, “Beyond basic research for inherited and orphan retinal diseases: successes and challenges,” *Retina*, **25**, No. 8 (Suppl. *The Proceedings of the First International Symposium on Translational Clinical Research for Inherited and Orphan Retinal Diseases: Sponsored by the National Neurovision Research Institute Inc.*), S15-S17 (2005).
  66. M. Corral-Debrinski and J.-A. Sahel, “Focus on optic neuropathies due to mitochondrial dysfunction: molecular basis and putative therapies,” *Expert Rev. Ophthalmol.*, **3**, Iss. 6, 599-603 (2008).
  67. H. M. Blau and M. L. Springer, “Gene therapy – a novel form of drug delivery,” *New Engl. J. Med.*, **333**, No. 18, 1204-1206 (1995).
  68. O. Gresch, F. B. Engel, D. Nestic, et al., “New non-viral method for gene transfer into primary cells,” *Methods*, **33**, Iss. 2, 151-163 (2004).
  69. A. Watson and D. Latchman, “Gene delivery into neuronal cells by calcium phosphate-mediated transfection,” *Methods*, **10**, Iss. 3, 289-291 (1996).
  70. J. Felgner, F. Frank, and P. L. Felgner, “Cationic lipid-mediated delivery of polynucleotides,” *Methods*, **5**, Iss. 1, 67-75 (1993).
  71. M. Cavazzana-Calvo and A. Fisher, “Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet?” *J. Clin. Invest.*, **117**, 1456-1465 (2007).
  72. X. Cai, Sh. M. Conley, Z. Nash, et al., “Gene delivery to mitotic and postmitotic photoreceptors via compacted DNA nanoparticles results in improved phenotype in a mouse model of retinitis pigmentosa,” *FASEB J.*, **24**, 1178-1191 (2010).
  73. D. Bok, “Retinal researchers have reasons to be optimistic,” *Retina*, **25**, No. 8 (Suppl. *The Proceedings of the First International Symposium on Translational Clinical Research for Inherited and Orphan Retinal Diseases: Sponsored by the National Neurovision Research Institute Inc.*), S43 (2005).
  74. E. Alton, “Progress and prospects: gene therapy clinical trials,” *Gene Ther.*, **14**, 1439-1447 (2007).
  75. J. Bainbridge, “Gene therapy clinical trials for inherited eye diseases,” *Expert Rev. Ophthalmol.*, **2**, Iss. 4, 517-519 (2007).
  76. P. A. Campochiaro, Q. D. Nguyen, S. M. Shan, et al., “Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for neovascular age-related macular degeneration: Results of a phase I clinical trial,” *Human Gene Ther.*, **17**, 167-176 (2006).
  77. P. Chevez-Barrois, M. Chintagumpala, W. Mieler, et al., “Response of retinoblastoma with vitreous tumor seeded by adenovirus-mediated delivery of thymidine kinase followed by ganciclovir,” *J. Clin. Oncol.*, **23**, 7927-7935 (2005).
  78. R. K. Koenekoop, I. Lopez, F. P. M. Cremers, et al., “Genetics, phenotypes, mechanisms and treatments for Leber congenital amaurosis: a paradigm shift,” *Expert Rev. Ophthalmol.*, **3**, Iss. 4, 397-415 (2008).
  79. Ji-jing Pang, Bo Chang, and A. Kumar, “Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 Leber congenital amaurosis,” *Mol. Ther.*, **13**, No. 3, 565-572 (2006).
  80. G. M. Acland, G. D. Aguirre, J. Bennett, et al., “Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness,” *Mol. Ther.*, **12**, 1072-1082 (2005).
  81. J. W. B. Bainbridge, A. J. Smith, S. S. Barker, et al., “Effect of gene therapy on visual function in Leber’s congenital amaurosis,” *New Engl. J. Med.*, **358**, 2231-2239 (2008).
  82. A. M. Maguire, F. Simonelli, E. A. Pierce, et al., “Safety and efficacy of gene transfer for Leber’s congenital amaurosis,” *New Engl. J. Med.*, **358**, 2240-2248 (2008).
  83. J. Bainbridge and R. Ali, “Gene therapy for inherited childhood blindness shows promise,” *Expert Rev. Ophthalmol.*, **3**, Iss. 4, 357-359 (2008).
  84. A. V. Cideciyan, T. S. Aleman, S. L. Boye, et al., “Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, No. 39, 15112-15117 (2008).
  85. A. V. Maguire, K. A. High, and A. Auricchio, “Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber’s congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial,” *Lancet*, **374**, Iss. 9701, 1597-1605 (2009).
  86. D. Amado, F. Mingozzi, D. Hui, et al., “Safety and efficacy of subretinal readministration of a viral vector in large animals to treat congenital blindness,” *Sci. Transl. Med.*, **2**, Iss. 21 (2010), 21ra16, doi:10.1126/scitranslmed.3000659.
  87. K. Mancuso, W. W. Hauswirth, Q. Li, et al., “Gene therapy for red-green color blindness in adult primates,” *Nature*, **461**, 784-787 (2009).
  88. J. Bennett, “Gene therapy for color blindness,” *New Engl. J. Med.*, **361**, No. 25, 2483-2484 (2009).
  89. J. Neitz and M. Neitz, “The genetics of normal and defective color vision,” *Vis. Res.*, **51**, 633-651 (2011).
  90. F. Simonelli, A. M. Maguire, F. Testa, et al., “Gene therapy for leber’s congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration,” *Mol. Ther.*, **18**, No. 3, 643-650 (2010).
  91. B. S. Pawlyk, O. V. Bulgakov, X. Liu, et al., “Replacement gene therapy with a human RPGRIP1 sequence slows photoreceptor degeneration in a murine model of leber congenital amaurosis,” *Human Gene Ther.*, **21**, 993-1004 (2010).
  92. S. Millington-Ward, N. Chadderton, M. O’Reilly, et al., “Suppression and replacement gene therapy for autosomal dominant disease in a murine model of dominant retinitis pigmentosa,” *Mol. Ther.*, **19**, 642-649 (2011), doi:10.1038/mt.2010.293 Original Article.
  93. M. Miyazaki, Y. Ikeda, Y. Yonemitsu, et al., “Pigment epithelium-derived factor gene therapy targeting retinal ganglion cell injuries: Neuroprotection against loss of function in two animal models,” *Human Gene Ther.*, **22**, 559-565 (2011).
  94. H. Mao, Th. James, Jr., and A. Schwein, “AAV delivery of wild-type rhodopsin preserves retinal function in a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa,” *Human Gene Ther.*, **22**, 567-575 (2011).
  95. J. T. Stout and P. J. Francis, “Surgical approaches to gene and stem cell therapy for retinal disease,” *Human Gene Ther.*, **22**, 531-535 (2011).
  96. M. J. Friedrich, “Gene therapy shows promise for ocular disorders,” *J. Am. Med. Assoc.*, **304**, No. 14, 1543-1545 (2010).
  97. P. A. Campochiaro, “Gene transfer for neovascular age-related macular degeneration,” *Human Gene Ther.*, **22**, 523-529 (2011).
  98. T. Costa, C. R. Scriver, and B. Childs, “The effect of mendelian

- disease on human health: A measurement," *Am. J. Med. Gen.*, **21**, 231-242 (1985).
99. A. V. Cideciyan, S. G. Jacobson, W. A. Beltran, et al., "Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement," *PNAS*, **110**, No. 6, E517-E525 (2013); publ. ahead print Jan. 22, 2013, doi:10.1073/pnas.1218933110.
100. M. E. McClements and R. E. Maclaren, "Seeing is believing: Gene therapy shows for retinal disease," *Transl. Res.*, **161**, Iss. 4, 241-254 (2013).
101. J. Cehajic-Kapetanovic, C. Eleftheriou, A. E. Allen, et al., "Restoration of vision with ectopic expression of human rod opsin," *Current Biol.*, **25**, Iss. 16, 2111-2122 (2015).
102. A. C. Ho, V. S. Humayun, J. D. Dorn, et al., "Long-term results from an epiretinal prosthesis to restore sight to the blind," *Ophthalmology*, **122**, Iss. 8, 1547-1554 (2015).