

---

---

**ЗРИТЕЛЬНАЯ  
СИСТЕМА**

---

---

УДК 612.84

**ПОСЛЕДНИЕ ДОСТИЖЕНИЯ В ОБЛАСТИ  
ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЗРЕНИЯ ПРИ СЕТЧАТОЧНОЙ  
НЕДОСТАТОЧНОСТИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

© 2010 г. **Е. М. Максимова**

*Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН  
127994 Москва, Б. Каретный пер., 19  
E-mail: maximova@iitp.ru*

Поступила в редакцию 14.01. 2010 г.

В последнее десятилетие получены новые данные о механизмах развития сетчатки млекопитающих, биологии стволовых клеток, генетических нарушениях, приводящих к зрительным расстройствам. На модельных животных отработаны приемы терапевтического вмешательства для восстановления зрения. Использование достижений фундаментальной науки в этих областях позволило перейти к терапии заболеваний сетчатки человека.

*Ключевые слова:* сетчатка млекопитающих, регенерация, стволовые клетки сетчатки, амауроз Лебера, RPE65, генная терапия.

## ВВЕДЕНИЕ

Сетчатка млекопитающих в отличие от сетчаток низших позвоночных и птиц не способна к регенерации (Григорян, 2003; Karl et al., 2008). Поэтому при повреждении сетчатки и вследствие этого частичной или полной утрате зрения, нет надежды на самовосстановление. В 80-е годы прошлого столетия рассматривалась возможность компенсации морфофункциональных нарушений в зрительной системе человека путем нейротрансплантации, чему способствовали обнадеживающие результаты опытов на модельных животных (Александрова, 1993). В последнее десятилетие (помимо трансплантации) рассматривается возможность воздействия сигнальными молекулами на собственные немногочисленные стволовые клетки взрослой сетчатки для усиления регенеративных процессов (Young, 2005; Osakada, 2007; Bennett, 2007). Самым надежным и оперативным, и уже реализуемым, способом восстановления нормальной зрительной функции оказалась генная терапия (Warrington Jr., Herzog, 2006; Bainbridge et al., 2008; Hauswirth et al., 2008; Maguire et al., 2008).

### **Ремоделирование сетчатки при дегенерации фоторецепторов**

При наследственных дегенеративных заболеваниях сетчатки, таких как возрастная макулярная дистрофия (ВМД), пигментные ретиниты, болезнь Штаргарта,

синдром Ушера, амауроз Лебера, а также при отслойке сетчатки или острым токсическом поражении, как правило, в первую очередь страдают фоторецепторы. Идея протезирования – замены утраченных фоторецепторов электронными или клеточными трансплантами представлялась реалистичной, при этом по умолчанию предполагалось, что нервные слои сетчатки не затрагиваются патологией. Однако в серии работ на сетчатке мышей как модельном объекте было показано, что при дегенерации фоторецепторов нервные слои взрослой сетчатки после утраты нормального афферентного притока не остаются неизменными. Наступает морфологическая перестройка (ремоделирование), что противоречит идее протезирования (Максимова, 2008). Морфологическая перестройка и перепрограммирование нервного процесса происходит в такой последовательности: *первая фаза* характеризуется стрессом клеток пигментного эпителия и фоторецепторов. Разрушаются синаптические терминалы фоторецепторов. Их аксоны, минуя предназначенные им мишени – биполяры и горизонтальные клетки, прорастают до ВСС и слоя ганглиозных клеток. Отмирают наружные сегменты палочек; родопсин начинает экспрессироваться во внутреннем сегменте рецепторов; ножки палочек втягиваются. Палочковые биполяры направляют дендриты к колбочковым ножкам. Отмирают наружные сегменты колбочек. *Вторая фаза* – смерть фоторецепторов, палочек и колбочек, деафферентация нервных слоев сетчатки и формирование дистальными отростками мюллеровских клеток фиброзного лист-

ка, отделяющего сетчатку от хороида, т.е. нарушение системы питания и водного обмена. В *третью фазу* перестройки большое количество нейронов умирает. Выжившие нейроны, лишённые нормальных входных сигналов, без дедифференциации мигрируют, их нейриты – одни втягиваются, другие прорастают к новым мишеням. В результате они замыкаются согласно медиаторно-рецепторной комплементарности в микронейромы. Тысячи микронейром располагаются у наружной и внутренней пограничных мембран сетчатки и даже в хороиде. Сетчатка теряет послойную организацию. Вновь возникшие в результате перестройки нервные каскады, отражающие попытки нейронов найти синаптические возбуждающие входные сигналы глутаматэргической природы для активации кальциевой проводимости и поддержания кальций-зависимых регуляторных процессов, не способны к поддержанию нормального процесса обработки зрительного сигнала (Marc et al., 2003; Strettoi E. et al., 2003; Jones et al., 2003; Marc et al., 2007; Marc et al., 2008; Punzo, Cerko, 2007; Punzo et al., 2007). Исследователи предсказали и промоделировали на выходе микронейром возникновение ритмической импульсной активности. Недавно на изолированных сетчатках взрослых (36–50 дневных) *gd* мышей (полная атрофия зрительных рецепторов) при регистрации активности переживших ганглиозных клеток методом *whole-cell recording* была действительно обнаружена осцилляторная спонтанная импульсная активность как в *on-*, так и в *off-* ганглиозных клетках. (О типе ганглиозной клетки судили по уровню стратификации ее дендрита во ВСС.) Ганглиозные клетки, помеченные внутриклеточно краской Alexa-594, были сохранены как морфологически, так и физиологически вплоть до семимесячного возраста мыши (Margolis et al., 2008). Перестройка, аналогичная описанной на мышах, была обнаружена и при экспериментальной отслойке сетчатки у кошки и на сетчатках людей, страдавших ВМД (Fisher et al., 2005; Lewis et al., 1998). В сетчатках, пораженных ВМД, большое количество синапсов фоторецепторных клеток втягиваются в НЯС. За этим следует отрастание дендритов постсинаптических биполяров и реформация синаптических контактов между рецепторами и биполярами. Таким образом, и нейроны взрослой сетчатки человека оказываются подверженными морфофункциональным изменениям. Эти анатомические изменения при ВМД происходят не только в макулярной области, но по всей сетчатке (Sullivan et al., 2007). Изменения в ретинограмме у пациентов с подозрением на ВМД (поскольку среди их старших родственников были случаи ВМД) обнаруживаются раньше заметных макроморфологических изменений, наблюдаемых при обследовании глазного дна. Они могут служить диагностическим признаком ранней фазы нарушения зрительного процесса, что очень важно хотя бы для терапии замедления развития заболевания, а в будущем, возможно, и для радикальной терапии (Jones et al., 2005; Bennett, 2007).

Ремоделирование в сетчатках животных и человека наступает неизбежно независимо от исходных молекулярных мишеней сетчаточной дегенерации, будь то дефекты пигментного эпителия сетчатки, фоторецепторов, родопсина или последующих элементов фототрансдукции (Jones et al., 2003).

Перестройка нервных слоев сетчатки, как уже отмечалось выше, казалось бы противоречит стратегиям протезирования. В то же время надежды на положительные результаты активного вмешательства медицины для восстановления зрения человека остаются, и работы в этом направлении продолжают (Delyfer et al., 2004). Оптимизм подкрепляется результатами фундаментальных исследований последнего десятилетия в области биологии стволовых клеток, изучения молекулярных сигнальных путей, определяющих судьбу клеток в процессе эмбриогенеза сетчатки *in vivo* и *in vitro*, успешными экспериментами по “воспитанию” стволовых клеток в культуре в требуемом русле и успешной трансплантации прогениторных клеток в сетчатку млекопитающих (Cerko et al., 1996; Morrow et al., 1998; Tomita et al., 2007). Возможность генетической и ранней клинической (ЭРГ) диагностики и медленное течение процесса перестройки, сохранность основных биохимических фенотипов переживающих нейронов и их морфологическая пластичность, относительная морфофизиологическая стабильность выходных нейронов сетчатки – ганглиозных клеток позволяют отрабатывать разные стратегии медицинского вмешательства (MacLaren, 2006; Reh, 2006; Corbo et al., 2007; Baker et al., 2009; Young, 2005; Adler 2008).

### Первая стратегия – трансплантация

С конца прошлого столетия на млекопитающих проводились опыты с успешной трансплантацией нервной ткани в разные отделы зрительной системы, в том числе в сетчатку (Александрова, 1993). Разнообразные трансплантаты (кусочки сетчатки с пигментным эпителием, суспензия клеток сетчатки, кусочки эмбриональной сетчатки, кусочки периферических нервов) помещались в субретинальное пространство, в рану сетчатки, на поверхность тектума или на место поврежденного зрительного нерва. Они переживали, оказывали положительное трофическое влияние на нервную ткань реципиента, предотвращали ее дальнейшую дегенерацию. Нейроны эмбриональной донорской сетчатки дифференцировались и интегрировались с сетчаткой реципиента. Аксоны ганглиозных клеток находили первичные зрительные центры. В последние годы наиболее плодотворной представляется трансплантация в сетчатку стволовых клеток, клеток – предшественников фоторецепторов (MacLaren, 2006).

### Источники донорских клеток

**Эмбриональные стволовые клетки.** Источниками донорских стволовых клеток для трансплантации могут быть эмбриональные стволовые клетки (hESC – human embryonic stem cells). Эмбриональные стволо-

вые клетки дифференцируются во все типы клеток в процессе развития, включая клетки ЦНС, в том числе и сетчатки (Aoki et al., 2009). После трансплантации стволовые клетки обладают способностью замещать клетки хозяина, утраченные в результате травмы или заболевания, и/или поставлять тканям хозяина терапевтические факторы, способствуя функциональному оздоровлению.

Была установлена способность нейтральных эмбриональных стволовых клеток мыши включаться в ткань сетчатки и предотвращать дегенерацию сетчатки у *mnd* мыши (модель ВМД человека). Эта мышца имеет наследственную патологию лизосомального накопления, характеризующуюся дегенерацией сетчатки и ЦНС. Через 16 недель после трансплантации в стекловидное тело взрослой мыши донорские клетки встроились в большинство слоев сетчатки, где они стали похожи морфологически и по картине экспрессии специфических белков-маркеров на клетки соответствующего слоя сетчатки реципиента. Присутствие этих донорских клеток коррелировало с уменьшением размеров и числа лизосомальных телец в клетках сетчатки хозяина. Присутствие трансплантированных донорских клеток также сопровождалось увеличением выживших клеток сетчатки хозяина, в особенности – фоторецепторов. Эти результаты показывают, что нейтральные эмбриональные стволовые клетки предохраняют нейроны хозяина от дегенерации и, по-видимому, замещают по крайней мере некоторые типы утраченных нейронов (Meyer et al., 2006; Adler, 2008).

Разработан метод для дифференцировки нейронов сетчатки из эмбриональных стволовых клеток человека (hES) *in vitro*. В соответствующих условиях культивирования до 80% линии H1 могут быть направлены по пути развития сетчаточных прогениторов с профилем экспрессии генов, сходным с профилем экспрессии генов в клетках сетчатки плода человека. В первую очередь прогениторы (hES) дифференцируются в нейроны внутренней сетчатки (ганглиозные и амакриновые) с функционирующими рецепторами глутамата. Прогениторы, произведенные из эмбриональных стволовых клеток человека, при совместном культивировании с сетчатками *mnd* мыши интегрируются в дегенерирующую сетчатку мыши и увеличивают экспрессию специфических маркеров фоторецепторных клеток (Lamba et al., 2006).

**Стволовые клетки глаза.** Известно, что во взрослом глазу рыб, амфибий и цыпленка в разных его частях существуют стволовые клетки. Они и служат источниками регенерации сетчатки в случае ее повреждений (Hitchcock et al., 2004; Moshiri et al., 2005). В глазу млекопитающих (в том числе у человека) тоже обнаружены редкие отдельные стволовые клетки. Они находятся в роговице, радужной оболочке, в непигментированном эпителии (*pars plana*) цилиарного тела (Торере, 2000; Amato et al., 2005; MacNeil et al., 2007). На границе пигментного эпителия с цилиарным телом (но не в самом пигментном эпителии) в глазу взрослой

мышы обнаружены отдельные клетки, которые клонально пролиферируют *in vitro*, образуя сферические колонии клеток, которые могут дифференцироваться в клетки сетчатки, такие как палочки, биполярные клетки и мюллеровскую глию, что говорит о возможной их гомологии с клетками герминальной зоны глаза немлекопитающих (Торере, 2000).

В глазу взрослого человека обнаружена небольшая популяция клеток ( $\approx 10.000$  клеток на глаз) со свойствами стволовых клеток (мультипотентных, способных к пролиферации и самовоспроизведению). Для выяснения их способностей *in vivo* диссоциированные клетки нейросфер сетчатки человека, содержащие и стволовые и прогениторные клетки, трансплантировали в глаза NOD/SCID мыши в первый постнатальный день. Клетки-потомки стволовых клеток сетчатки человека выживали, мигрировали, интегрировались и дифференцировались в нервные слои сетчатки, главным образом как фоторецепторы (Cole et al., 2004).

**Прогениторные клетки роговицы, радужки и цилиарного тела.** В периферической и центральных частях эпителия роговицы содержится значительное количество клеток-предшественников. На периферии их больше и они обладают большей способностью к самовоспроизведению (Mimura et al., 2005). Стволовые клетки, полученные из роговицы взрослых мышей и взрослых людей, могут пойти по пути дифференцирования в светочувствительные фоторецепторные клетки под влиянием экзогенно приложенного фактора *Crx* (Jomary, Jones, 2007; Jomary et al., 2010).

Изучали возможность использования клеток радужки в качестве донорских при сетчаточной трансплантации (Takahashi, 2001). В культуре были получены клетки, подобные фоторецепторам, из взрослых клеток радужки, как у приматов так и у грызунов, путем индукции транскрипционных факторов. У приматов комбинация факторов *Crx* и *NeuroD* необходима для того, чтобы в прогениторных клетках, полученных из радужки, развился рецептор-специфический фенотип. Более того, фоторецептор-подобные клетки, полученные из ткани радужки у крыс и приматов, дают палочко-специфические реакции на свет после трансфекции *Crx* или *Crx-NeuroD* соответственно. Клетки, произведенные из радужки, интегрируются в развивающуюся сетчатку хозяина при совместном культивировании (Akagi et al., 2005). Прогениторные клетки обнаружены не только в радужке, но и в парс плана цилиарного тела во взрослых глазах свиньи, мыши и человека. При культивировании в присутствии факторов роста эти клетки пролиферируют, образуя нейросферы, в которых находятся клетки, экспрессирующие сетчаточные маркеры. При использовании монослойного культивирования количество таких клеток может быть увеличено в миллион раз при поддержании их прогениторного фенотипа (MacNeil, 2007). Прогениторные клетки парс плана цилиарного тела и радужки легко доступны при рутинных операциях у человека (Cole et al., 2004). Трансфекция стволовых клеток взрослой сетчатки человека фактором *Crx* направляет их по

пути дифференцирования фоторецепторного фенотипа (Jomary et al., 2010).

**Стволовые клетки пигментного эпителия.** Клетки пигментного эпителия сетчатки развиваются из мультипотентных клеток зрительного нейроэпителия в непосредственной близости к сетчатке и необходимы для органогенеза глаза и зрения. Трансплантаты эмбриональных (E17) клеток пигментного эпителия цыпленка, пересаженные в глаз крысы, превращались *in vivo* в фоторецепторы. Клетки пигментного эпителия в культуре сохраняют свои значительные регенеративные способности. Направленные к трансдифференцированию по пути фоторецепторного развития (при помощи *NeuroD*) они развиваются в хорошо организованную клеточную структуру. Способности клеток пигментного эпителия к самоорганизации и к трансдифференцированию делают их кандидатами для трансплантации для лечения дегенеративных заболеваний сетчатки человека (Azuma, 2005; Bharti., 2006; Liang et al., 2006).

Итак, трансплантированные стволовые клетки способны производить разные типы клеток сетчатки, в том числе фоторецепторы, устанавливающие нормальные синаптические контакты и в сетчатках млекопитающих (Merhi-Soussi et al., 2006). Однако эффективность такой стратегии для лечения дегенеративных заболеваний сетчатки человека остается проблематичной.

### **Вторая стратегия – повышение активности внутренних сетчаточных прогениторов**

**Стволовые клетки собственно сетчатки.** В процессе развития глаза у всех животных, в том числе у млекопитающих, внутри эпителия цилиарного тела, его парс плана, в продолжение слоя периферической сетчатки существует слой прогениторных клеток. У мышей и в цилиарном эпителии и в сетчатке этот слой быстро уменьшается и исчезает к девятому постнатальному дню (P9). В парс плана цилиарного эпителия мыши обнаружены многочисленные постмитотические предшественники палочек и колбочек, которые быстро развиваются морфологически и уменьшаются количественно по мере развития глаза. Предшественников палочек уже не видно в парс плана к P12, тогда как отдельные редкие колбочковые предшественники сохраняются до P120. При фоторецепторной дегенерации, вызванной УФ, отмечено увеличение колбочковых предшественников в парс плана во много раз (Nishiguchi et al. 2008).

Несмотря на то что в эпителии цилиарного тела взрослой сетчатки млекопитающих сохраняются стволовые клетки, способные *in vitro* производить клетки сетчатки (как отмечалось выше), оставалось неясно какова их активность *in vivo*. Оказалось, что предсказуемая и время-зависимая смерть ганглиозных клеток влияет на активность прогениторов в цилиарном теле (Nickerson et al., 2007). ГК повреждали аксотомией. Определяли фенотип в заново генерируемых прогениторах цилиарного

тела крысы. Были обнаружены две популяции нестин-экспрессирующих клеток в цилиарном теле поврежденного глаза. Одна – в сосудах, другая в цилиарном эпителии. Аксотомия усиливает пролиферацию в цилиарном теле, которая начинается до установления смерти ГК и прослеживается до пика их смертности. Нестин и рекаверин, которые в норме существуют только в рецепторах и биполярах, отмечены в повышенном количестве в клетках цилиарного тела (Turner, Серко, 1987).

Чтобы усилить пролиферацию прогениторов взрослой сетчатки и дифференцировать их соответствующим образом, необходимо произвести некоторые манипуляции. Один из путей – это модулирование Wnt-катенин сигнального пути – терапевтическая стратегия для усиления замещения утраченных нейронов, генерированием клеток, полученных из внутресетчаточных прогениторов. (Wnt-белки играют важную роль в многочисленных событиях в процессе эмбриогенеза, так в ЦНС они определяют судьбы клеток, пролиферации клеток, роста аксона, а также в развитии дендритов и синапсов (Das et al., 2005).) Хотя количество фоторецепторных клеток, полученных из пролиферирующих клеток обнадеживающе, нужны дополнительные исследования, чтобы заключить, что регенерировавшие фоторецепторы интегрируются в функциональный процесс в сетчатке. Прогрессирование заболевания может ограничить потенциал регенерации. Таким образом, представлено первое свидетельство регуляции регенерации нейронов взрослой сетчатки после повреждения за счет активации Wnt-катенин сигнального пути (Kubo et al., 2003; Inoue et al., 2006). Эта внутренняя, присущая ЦНС, активность может быть усилена добавлением извне активаторов Wnt-сигнального пути (Nickerson et al., 2007; Osakada et al., 2007).

**Мюллеровские клетки как источник прогениторов.** Был построен молекулярный атлас экспрессии генов в развивающейся и зрелой сетчатке мыши. Для каждого развивающегося и зрелого главного класса клеток сетчатки были идентифицированы гены, селективно экспрессирующиеся в каждом из этих типов. Было показано, что профили экспрессии генов мюллеровских клеток и митотических прогениторных клеток очень похожи, из чего можно предположить, что мюллеровская глия в соответствующих условиях способна дать начало многим типам клеток сетчатки (Blackshaw et al., 2004).

Было показано, что после острого нейротоксического повреждения во взрослой сетчатке млекопитающих *in vivo* мюллеровские клетки дедифференцируются (претерпевают обратное развитие) и производят различные нейроны сетчатки, в том числе фоторецепторы (Ooto et al., 2004; Karl et al., 2008). Однако число этих вновь сгенерированных нейронов очень ограничено. Активация Wnt-катенин сигнального пути способствует пролиферации прогениторных клеток, вознивших из мюллеровской глии и нервной регенерации после повреждения или в процессе дегенерации. Воздействие Wnt3a на сетчатку с поврежденными рецеп-

торами в 20 раз увеличивает пролиферацию дедифференцированных мюллеровских клеток. В этом случае добавление ретиноевой или валпроевой кислот вызывает дифференциацию возникших прогениторных клеток в первую очередь в *Crx* (cone-rod homeobox)-положительные и родопсин-положительные фоторецепторы (Jomary et al., 2008; Osakada et al., 2007). Активация Wnt сигнального пути способствует регенерации сетчатки, и напротив, подавление этого пути ослабляет регенерацию.

Таким образом, дегенерирующая сетчатка млекопитающих сохраняет некоторую способность для регенерации нервных клеток. Увеличение численности одиночных стволовых клеток, обнаруженных во взрослой сетчатке млекопитающих, и влияние на их судьбу соответствующими сигнальными молекулами представляется в будущем более рациональным способом терапевтического воздействия (по сравнению с трансплантацией) при лечении патологий сетчатки человека.

### Третья стратегия – генная терапия

Молекулярно-генетические исследования выявили сотни генов, дисфункция или утрата которых вызывает известные клинические синдромы. Наследственный амавроз Лебера (LCA – Leber congenital amaurosis) – название группы гетерогенных аутосомальных рецессивных расстройств, серьезных нарушений зрения с детства. LCA 2 – одна из форм амавроза Лебера – прогрессирующая частичная слепота с момента рождения, к 20–30 годам переходящая в полную слепоту (Lorenz et al., 2000). Внешние проявления – сокращение поля зрения (туннельное зрение), нистагм, отсутствие зрачковой реакции, отсутствие палочковой ЭРГ, значительно сниженная колбочковая ЭРГ (Jacobson et al., 2008). Субъективно – невозможность чтения, ориентации в пространстве, особенно при низких уровнях освещенности, едва различение света от тьмы (Simonelli et al., 2007; 2008).

Однако несмотря на тяжесть заболевания, больные LCA2 (сравнительно с другими формами LCA) сохраняют минимальные зрительные способности до 8–12 лет, нормальную толщину сетчатки в макулярной области (по показаниям оптической когерентной томографии) и нормальную автофлуоресценцию глазного дна (Simonelli et al., 2007; Bertone et al., 2007). В зрительной коре у людей с LCA2 патологией методом магнитно-резонансной томографии отмечается сниженная активность при стимуляции светом малой интенсивности и практически нормальный объем активности при стимуляции ярким светом (Aguirre et al., 2007). Такая клиническая картина вызывается дисфункцией гена *RPE65*, который экспрессируется в клетках пигментного эпителия сетчатки (Gu et al., 1997). Мутация этого гена приводит к уменьшению продукции родопсина (который в норме составляет 92% от строительных белков фоторецепторной мембраны) и, как следствие, к потере зрения. Экс-

прессия *RPE65* начинается как раз перед развитием фоторецепторов в сетчатке (Jacobson et al., 2007).

При поглощении кванта света хромофор родопсина – альдегид витамина А – 11-*cis*-ретиноид переходит из 11-*cis* в *all-trans* состояние и затем отщепляется от опсина. Продукты распада родопсина поступают в клетки пигментного эпителия, где и происходит ресинтез зрительного пигмента – это так называемый зрительный цикл (Каламкарров, Островский, 2002). Известно, что *RPE 65* кодирует микросомальный белок в клетках пигментного эпителия, который играет роль в метаболизме витамина А. Точная роль кодируемого *RPE65* белка не определена. По одной из гипотез считается, что этот белок связывает ретиноид и предлагает его ретинольной изомеразе для перевода *all-trans*-ретиноид эфиром обратно в 11-*cis*-ретиноид (Redmond et al., 1998). Зрительные циклы пигментов палочек и колбочек похожи. Однако ресинтез пигмента колбочек частично проходит и в мюллеровских клетках (Kusakabe et al., 2009; Wang et al., 2009). Это обстоятельство может объяснять относительную сохранность колбочкового зрения при LCA2.

**Животные – модели LCA2 человека.** Подробности механизма нарушения зрительной функции и возможности генной терапии изучаются на модельных животных, у которых сходные по клинической картине заболевания вызываются дисфункцией гомологичных генов (Song et al., 2007). Для изучения LCA2 была сконструирована мышь с нокаутом по гену *Rpe65*. У этой мыши в сумеречной ЭРГ (скотопической) были уменьшены волны (a-, b-, c-). Фотопическая (колбочковая) ЭРГ при этом была сохранна, что говорит о том, что нокаут *Rpe65* влияет в первую очередь на палочковую функцию. Кроме того, сетчатка такой мыши лишена родопсина и 11-*cis*-ретинола при избыточном накоплении в клетках пигментного эпителия *all-trans*-ретиноид эфиров. Это говорит о блокировании зрительного цикла в пигментном эпителии. Световая и электронная микроскопия выявляет укорочение и дезорганизацию наружных сегментов палочек, а на поздних стадиях укорочение наружных сегментов колбочек. Со временем утоньшается наружный ядерный слой за счет уменьшения количества ядер фоторецепторов (Redmond, Hamel, 2000). Утоньшение сетчатки (вне макулярной области) за счет утоньшения наружного ядерного слоя выявляется и на томограмме сетчатки у людей больных LCA2 (Hauswirth, et al. 2008).

Заболевание, аналогичное LCA2 человека, известно у собак (the Swedish Briard dog) с делецией 4-бп у *Rpe65*-гомозигот (Veske et al., 1999). Этот генетический дефект приводит к образованию нефункционального мутантного белка и нарушению зрительного цикла. В результате эти собаки страдают от аутосомальной прогрессирующей сетчаточной дистрофии с раннего возраста. Скотопическая ЭРГ уменьшена или вовсе отсутствует, а фотопическая ЭРГ относительно сохранена (Narfstrom et al., 1989; Redmond et al., 1998). Наружные сегменты палочек обнаруживают следы ранних прогрессирующих дегенеративных изменений. Колбочки

поначалу находятся в лучшей сохранности, но у старых животных имеют укороченные наружные сегменты. Длительная относительная сохранность колбочек возможно объясняется тем, что восстановление зрительного пигмента колбочек проходит не только в клетках пигментного эпителия, но и частично в мюллеровских клетках (Mata et al., 2002; Wolf, 2004; Wang et al., 2009; Kusakabe et al., 2009). Магнитно-резонансная томография обнаруживает у собак с мутацией *Rpe65* значительно сниженные реакции на свет, как в сетчатке, так и в подкоре, и минимальные реакции в первичной зрительной коре.

Для восстановления зрения разработаны приемы доставки нормальных генов в глаза модельных животных при помощи аденовирусов. Субретинальные инъекции rAAV. *Rpe65* (векторное введение нормального гена *Rpe65*) приводило к стабильному длительному функциональному улучшению зрения у собак. Восстановление зрения происходит быстро, даже у взрослых собак (1–4 лет). Кортикальные ответы восстанавливаются в течение месяца и наблюдались на протяжении 2.5 лет после лечения (Aguirre et al., 2007). Собака (the Swedish Briard dog) по кличке Ланселот видит уже десятый год (Acland et al., 2001; 2005; Ford et al., 2003).

Привнесение нормального гена было успешно и в восстановлении зрительной функции у мышей с нокаутом *Rpe65* (Bemelmans et al., 2006; Pang et al., 2006).

Важно и то, что однократное интраокулярное субретинальное введение вектором нормальных генов не вызывало осложнений, в том числе и у обезьян (Jacobson et al., 2006; Warrington Jr., Herzog, 2006). Генная терапия применительно к глазным врожденным заболеваниям безопасна благодаря существованию гематоокулярного барьера.

*Успешная генная терапия LCA2 у людей.* В 2008 г. объявлены первые положительные результаты генной терапии амавроза Лебера (LCA2) у человека (Bainbridge et al., 2008; Maguire, 2008; Hauswirth et al., 2008). Ген *Rpe65* человеческого белка пигментного эпителия весом 65-kDa, связанный с аденовирусом (AAV2-h*Rpe65*v2), был инъецирован в субретинальное пространство в процессе витректомии в один (хуже видящий) глаз. Были испробованы разные дозы: малая –  $1.5 \times 10^{10}$  векторных частиц, средняя –  $4.8 \times 10^{10}$  векторных частиц, высокая –  $1.5 \times 10^{11}$  векторных частиц на 1 мл. Перед операцией людей тщательно обследовали и тестировали их зрительные возможности. Представлены данные за два периода с момента операции (через 5 мес и 12 мес) на трех пациентах в каждом исследовании (Bainbridge et al., 2008; Cideciyan et al., 2009; Maguire, 2008; Jacobson et al., 2008). Сейчас в мире прооперировано двенадцать человек разных возрастов от 8 до 44 лет. Пациенты находятся под регулярным наблюдением. Все пациенты ощущают в разной степени улучшение зрения. По объективным показателям через 2–4 недели после однократной инъекции в один глаз под сетчатку в районе ее лучшей сохранности (по показаниям томографии сетчатки),

вблизи макулярной области улучшение зрения было отмечено у половины пациентов: появилась зрачковая реакция, уменьшилось количество произвольных движений глаз, увеличился сигнал локальной ретинограммы на световые стимулы, в том числе на слабые, повысилась острота зрения, повысилась светочувствительность, оцененная по зрачковому рефлексу, увеличилась активность в зрительной коре. Все это говорит о том, что инъецированный нормальный ген встроился и заработал – нормализовал ресинтез зрительного пигмента. Не отмечено никаких специальных послеоперационных осложнений.

Как и ожидалось, наилучшие результаты, как по субъективным ощущениям, так и по объективным показателям, отмечаются у детей. Ранее считавшиеся узаконенно слепыми (legal blind), они после генной терапии могут обходиться без помощи специального наставника на уроках, ориентироваться и обходить препятствия при низких уровнях освещения (специальный тест), играть со сверстниками в подвижные игры, кататься на двухколесном велосипеде. Зрение в оперированном глазу не восстановилось полностью, но дети перестали быть слепыми. При очередных обследованиях через полгода, год, полтора года никакой динамики изменения зрительных возможностей не было отмечено.

Все это говорит о том, что инъецированный нормальный ген встроился и заработал – нормализовал ресинтез зрительного пигмента в клетках пигментного эпителия. Высшие отделы зрительного анализатора оказались способными воспринять сигналы от восстановленных фоторецепторов, несмотря на многолетнюю депривацию.

#### **“Вылечивание” дихроматии самцов обезьян Нового Света.**

Отдельного внимания заслуживает сообщение о повышении размерности цветового зрения у самцов обезьян Нового Света путем субретинального векторного введения гена красночувствительного пигмента человека (Mancuso et al., 2009).

Генетические механизмы организации цветового зрения у обезьян Старого и Нового Света различны. Цветовое зрение человека (и обезьян Старого Света) трихроматично. Трихроматизм обеспечивают три гена: гены зелено- и красночувствительного пигментов, находящиеся в X-хромосоме, и ген синечувствительного пигмента – в седьмой хромосоме. У обезьян Нового Света (помимо гена синечувствительного пигмента в седьмой хромосоме) в X-хромосоме содержится только один полиморфный ген средневолночувствительного пигмента (1 из 3 возможных аллелей). Поэтому все самцы – дихроматы. У них два типа колбочек, синечувствительные и зеленочувствительные. Кривые спектральной чувствительности средневолночувствительных колбочек у разных животных различаются в зависимости от аллеля, присутствующего в X хромосоме. Гомозиготные самки тоже дихроматы. Только гетерозиготные самки – трихроматы (Neitz, Neitz, 2000; Jacobs, Nathans, 2009).

Интраокулярно в субретинальное пространство двум взрослым самцам саймири был введен вектором ген красночувствительного пигмента человека под промоуером зеленочувствительного пигмента. (Было произведено три инъекции по 100 мкл,  $2.7 \times 10^{13}$  вирусных частиц. Меньшее количество, введенное ранее другим обезьянам, было недостаточно). О том, что вирус достиг мишеней (наружных сегментов средневолновочувствительных колбочек) можно было судить по флуоресценции GFP, встроенного в конструкт. С 9 по 40 неделю после операции наблюдаемая флуоресценция увеличивалась. Через 24 недели у обезьян появилась чувствительность в красной области спектра, стала регистрироваться фокальная ретинограмма на красные стимулы и одновременно с этим в психофизических тестах на псевдоизохроматических таблицах самцы, бывшие дихроматы, стали себя вести как трихроматы. Эффект “вылечивания” дихроматии у обезьяны-самца по имени Дальтон сохраняется уже два года. Гистологическое исследование сетчатки другой обезьяны, тоже ставшей трихроматом, но умершей через год после операции от пневмонии, показало, что ген красночувствительного пигмента человека (меченый GFP) встроился в 15–36% зеленочувствительных колбочек (Mancuso et al., 2009).

Исследователи, окрыленные успехом генной терапии LCA2, очень редкого заболевания и повышения размерности цветового зрения обезьян, надеются в скором времени начать генную терапию и других врожденных заболеваний сетчатки, в частности, возрастной макулярной дистрофии, от которой страдают многие люди старше 60 лет.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александрова М.А.* Биологические подходы к проблеме восстановления зрения // Успехи современной биологии. 1993. Т. 113. С. 741–751.
- Григорян Э.Н.* Сетчатка позвоночных: внутренний клеточный резерв для регенерации // Онтогенез. 2003. Т. 34. № 6. С. 417–431.
- Каламкар Г.П., Островский М.А.* Молекулярные механизмы зрительной рецепции. М.: Наука, 2002. 279 с.
- Максимова Е.М.* Нейромедиаторы сетчатки и перестройки в нервных слоях сетчатки при дегенерации фоторецепторов // Сенсорные системы. 2008. Т. 22. С. 36–51.
- Acland G.M., Aguirre G.D., Bennett J., Aleman T.S., Cideciyan A.V., Benniselli J., Dejneka N.S., Pearce-Kelling S.E., Maguire A.M., Palczewski K., Hauswirth W.W., Jacobson S.G.* Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness // Mol. Ther. 2005. V. 12. N 6. P.1072–1082.
- Acland G.M., Aguirre G.D., Ray J, Zhang Q., Aleman T.S., Cideciyan A.V., Pearce-Kelling S.E., Anand V., Zeng Y., Maguire A.M., Jacobson S.G., Hauswirth W.W., Bennett J.* Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness // Nat Genet. 2001. V. 8. P. 92–95.
- Adler R.* Curing Blindness with Stem Cells: Hope, Reality, and Challenges // Recent Advances in Retinal Degeneration / Eds R.E. Anderson et al. Springer, 2008.
- Akagi T., Akita J., Haruta M., Suzuki T., Honda Y., Inoue T., Yoshiura S., Kageyama R., Yatsu T., Yamada M., Takahashi M.* Iris-Derived Cells from Adult Rodents and Primates Adopt Photoreceptor-Specific Phenotypes // Investig. Ophthalmol. Vis. Sci., 2005. V. 46. N 9. P. 3411–3419.
- Aguirre G.K., Koma'romy A.V., Cideciyan D.H., Brainard T.S., Aleman A.J., Roman B.B., Avants J.* Canine and Human Visual Cortex Intact and Responsive Despite Early Retinal Blindness from RPE65 Mutation // PLoS Medicine. 2007. V. 4. P. 1117–1128.
- Amato M. A., Arnault E., Perron M.* Retinal stem cells in vertebrates: parallels and divergences // Int. J. Dev. Biol. 2004. V. 48. P. 993–1001.
- Aoki H., Hara A., Niwa M., Yamada Y., Kunisada T.* In Vitro and In Vivo Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Into Retina-Like Organs and Comparison With That From Mouse Pluripotent Epiblast Stem Cells // Developm. Dynamics. 2009. V. 238. P. 2266–2279.
- Azuma N., Tadokoro K, Asaka A., Yamada M., Yamaguchi Y., Handa H., Matsushima S., Watanabe T., Kida Y., Ogura T., Torii M., Shimamura K., Nakafuku M.* Transdifferentiation of the retinal pigment epithelia to the neural retina by transfer of the Pax6 transcriptional factor // Human Molec. Gen. 2005. V. 14. N 8. P. 1059–1068.
- Bainbridge J.W.B., Smith A.J., Barke S.S, Robbie S., Henderson R., Balaggan K., Viswanathan A., Holder G.E., Stockman A., Tyler N., Petersen-Jones S., Bhattacharya S.S., Thrasher A.J., Fitzke F.W., Carter B.J., Rubin G.S., Moore A.T., Ali R.R.* Effect of Gene Therapy on Visual Function in Leber's Congenital Amaurosis // N. Engl. J. Med. 2008. V. 358. P. 2231–2238.
- Bainbridge J.W.B., Ali R.R.* Gene therapy for inherited childhood blindness shows promise // Expert Rev. Ophthalmol. 2008. V.3. P. 357–359.
- Baker P.S., Brown G.C.* Retinal, vitreous and macular disorders // Current Opin. Ophthalmol. 2009. V. 20. P. 175–181.
- Bemelmans A.P., Kostic C., Crippa S.V., Hauswirth W.W., Lem J.* Lentiviral gene transfer of RPE65 rescues survival and function of cones in a mouse model of Leber congenital amaurosis // Am. J. Hum. Genet. 2006. V. 79. N 3. P. 556–561.
- Bennett J.* Retinal Progenitor Cells – Timing Is Everything // New Engl. Med. 2007. V. 356. P. 1577–1579.
- Bharti K., Nguyen M.-T. T., Skuntz S., Bertuzzi S., Arnheiter H.* The other pigment cell: specification and devel-

- opment of the pigmented epithelium of the vertebrate eye // *Pigment Cell Res.* 2006. V. 19. P. 380–394.
- Blackshaw S., Harpavat S., Trimarchi J., Li Cai, Huang H., Kuo W.P., Weber G., Lee K., Fraioli R.E., Cho S.-H., Yung R., Asch E., Ohno-Machado L., Wong W.H., Cepko C.L.* Genomic Analysis of Mouse Retinal Development // *PLoS Biology.* 2004. V. 2. P. 1411–1431.
- Cepko C.L., Austin C.P., Yang X., Alexiades M., Ezzeddine D.* Cell fate determination in the vertebrate retina // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 589–595.
- Cideciyan A.V., Aleman T.S., Boye S.L., Schwartz S.B., Kaushal S., Roman A.J., Ji-jing Pang, Sumaroka A., Windsor E.A., Wilson J.M., Flotte T.R., Fishman G.A., Heon E., Stone E.M., Byrne B.J., Jacobson S.G., Hauswirth W.W.* Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics // *PNAS.* 2008. V. 105. N 39. P. 15112–15117.
- Cideciyan A.V., Hauswirth W.W., Aleman T.S., Kaushal S., Schwartz S.B., Boye S.L., Windsor E.A.M., Conlon T.J., Sumaroka A., Ji-jing Pang, Roman A.J., Byrne B.J., Jacobson S.G.* Human RPE65 Gene Therapy for Leber Congenital Amaurosis: Persistence of Early Visual Improvements and Safety at 1 Year // *Human Gene Therapy.* 2009. V. 20. P. 1–6.
- Coles B.L., Angenieux B., Inoue T., Rio-Tsonis K.D., Spence J.R., McInnes R.R., Arsenijevic Y., van der Kooy D.* Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004. V. 101. P. 15772–15777.
- Corbo J.C., Myers C.A., Lawrence K.A., Jadhav A.P., Cepko C.L.* A typology of photoreceptor gene expression patterns in the mouse // *PNAS.* 2007. V. 104. N 29. P. 12069–12074.
- Das A.V., Hegde G.V., Mallya K., Ahmad I.* Wnt Signaling Regulates the Differentiation of Retinal Stem Cells/Progenitors Into RGCs // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005. V. 46. P. 3232–3237.
- Delyfer M.-N., Léveillard T., Mohand-Saïd S., Hicks D., Picaud S., Sahel J.-A.* Inherited retinal degenerations: therapeutic prospects // *Biol. Cell.* 2004. V. 96. N 4. P. 261–269.
- Fisher S.K., Lewis G.P., Linberg K.A., Verardo M.R.* Cellular remodeling in mammalian retina: results from studies of experimental retinal detachment // *Prog. Retin. Eye Res.* 2005. V. 24. P. 395–431.
- Gu S.M., Thompson D.A., Srikumari C.R., Lorenz B., Finckh U., Nicoletti A., Murthy K.R., Rathmann M., Kumaramanickavel G., Denton M.J., Gal A.* Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy // *Nat. Genet.* 1997. V. 17. P. 194–197.
- Hauswirth W.W., Aleman T.S., Kaushal S., Cideciyan A.V., Schwartz S.B., Wang L., Conlon T.J., Boye S.L., Flotte T.R., Byrne B.J., Jacobson S.G.* Phase I trial of Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: Shortterm results // *Hum. Gene.* 2008. P. 1–36.
- Hitchcock P.F., Ochocinska M.J., Sieh A., Otteson D.C.* Persistent and injury-induced neurogenesis in the vertebrate retina // *Prog. Retin. Eye Res.* 2004. V. 23. P. 183–194.
- Jacobs G. H., Nathans J.* The Evolution of Primate Color Vision // *Scientific Am.* 2009. P. 56–65.
- Jacobson S.G., Acland G.M., Aguirre G.D., Aleman T.S., Schwartz S.B., Cideciyan A.V., Zeiss C.J., Komaromy A.M., Kaushal S., Roman A.J., Windsor E.A., Sumaroka A., Pearce-Kelling S.E., Conlon T.J., Chiodo V.A., Boye S.L., Flotte T.R., Maguire A.M., Bennett J., Hauswirth W.W.* Safety of recombinant adeno-associated virus type 2-RPE65 vector delivered by ocular subretinal injection // *Mol Ther.* 2006. V. 13. P. 1074–1084.
- Jacobson S.G., Aleman T.S., Cideciyan A.V., Heon E., Golczak M., Beltran W.A., Sumaroka A., Schwartz S.B., Roman A.J., Windsor E.A., Wilson J.M., Aguirre G.D., Stone E.M., Palczewski K.* Human cone photoreceptor dependence on RPE65 isomerase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. N 38. P. 15123–15128.
- Jacobson S.G., Cideciyan A.V., Aleman T.S., Sumaroka A., Windsor E.A.M., Schwartz S.B., Heon E., Stone E.M.* Photoreceptor Layer Topography in Children with Leber Congenital Amaurosis Caused by RPE65 Mutations // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008. V. 49. P. 4573–4577.
- Jomary C., Jones S.E.* Induction of Functional Photoreceptor Phenotype by Exogenous Crx Expression in Mouse Retinal Stem Cells // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007. V. 48. P. 5266–5275.
- Jomary C., Jones S.E., Lotery A.J.* Generation of Light-Sensitive Photoreceptor Phenotypes by Genetic Modification of Human Adult Ocular Stem Cells with Crx // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010. V. 51. P. 1181–1189.
- Jones B.W., Watt C.B., Marc R.E.* Retinal remodelling // *Clin. Exp. Optom.* 2005. V. 88. N 5. P. 282–291.
- Jones B.W., Watt C.B., Frederick J.M., Baehr W., Chen C.K., Levine E.M., Milam A.H., Lavail M.M., Marc R.E.* Retinal remodeling triggered by photoreceptor degenerations // *J. Comp. Neurol.* 2003. V. 464. P. 1–16.
- Inoue T., Kagawa T., Fukushima M., Shimizu T., Yoshinaga Y., Takada S., Tanihara H., Taga T.* Activation of Canonical Wnt Pathway Promotes Proliferation of Retinal Stem Cells Derived from Adult Mouse Ciliary Margin // *Stem Cells.* 2006. V. 24. P. 95–104.
- Karl M.O., Hayes S., Nelson B.R., Tan K., Buckingham B., Reh T.A.* Stimulation of neural regeneration in the mouse retina // *PNAS.* 2008. V. 105. N 49. P. 19508–19513.



- Kubo F., Takeichi M., Nakagawa S.* Wnt2b controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone // *Development*. 2003. V. 130. P. 587–598.
- Kusakabe T.G., Takimoto N., Jin M., Tsuda M.* Evolution and the origin of the visual retinoid cycle in vertebrates // *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2009. V. 364. P. 2897–2910.
- Lamba D.A., Karl M.O., Ware C.B., Reh T.A.* Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells // *PNAS*. 2006. V. 103. P. 12769–12774.
- Lewis G.P., Linberg K.A., Fisher S.K.* Neurite outgrowth from bipolar and horizontal cells after experimental retinal detachment // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 1998. V. 39. P. 424–434.
- Lorenz B., Gyürüs P., Preising M., Bremser D., Gu S., Andrassi M., Gerth C., Gal A.* Early-Onset Severe Rod-Cone Dystrophy in Young Children with RPE65 Mutations // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2000. V. 41. P. 2735–2742.
- MacLaren R.E., Pearson R.A., MacNeil A., Douglas R.H., Salt T.E., Akimoto M., Swaroop A., Sowden J.C., Ali R.R.* Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors // *Nature*. 2006. V. 444. P. 203–207.
- MacNeil A., Pearson R.A., MacLaren R.E., Smith A.J., Sowden J.C., Ali R.R.* Comparative Analysis of Progenitor Cells Isolated from the Iris, Pars Plana, and Ciliary Body of the Adult Porcine Eye // *Stem Cells*. 2007. V. 25. P. 2430–2438.
- Maguire A.M., Simonelli F., Pierce, E. A., Pugh E.N., Mingozzi F., Bennicell J., Banfi S., Marshall K. A., Testa F., Surace E.M., Rossi S., Lyubarsky A., Arruda V.R., Konkle B., Stone E., Sun J., Jacobs J., Lou Dell'Osso, Hertle R., Jian-xing M., Redmond T.M., Xiaosong Zhu, Hauck B., Zelenia O., Shindler K.S., Maguire M.G., Wright J.F., Volpe N.J., McDonnell J.W., Auricchio A., High K.A., Bennett J.* Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber's Congenital Amaurosis // *N. Engl. J. Med*. 2008. V. 358. P. 2240–2248.
- Mancuso K., Hauswirth W.W., Li Q., Connor T.B., Kuchenbecker J.A., Mauck M.C., Neitz J., Neitz M.* Gene therapy for red-green colour blindness in adult primates // *Nature*. 2009. V. 08401. P. 1–5.
- Marc R.E., Jones B.W., Watt C.B., Strettoi E.* Neural Remodeling in Retinal Degeneration // *Prog. Retin. Eye Res*. 2003. V. 22. P. 607–655.
- Marc R.E., Jones B.W., Anderson J.R., Kinard K., Marshak D.W., Wilson J.H., Wensel T., Lucas R.J.* Neural Reprogramming in Retinal Degeneration // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2007. V. 48. N 7. P. 3364–3371.
- Marc R.E., Jones B.W., Watt C.B., Vazquez-Chona F., Vaughan D.K., Organisciak D.T.* Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration // *Molecular Vision*. 2008. V. 14. P. 782–805.
- Margolis D. J., Newkirk G., Euler T., Detwiler P.B.* Functional Stability of Retinal Ganglion Cells after Degeneration-Induced Changes in Synaptic Input // *J. Neuroscience*. 2008. V. 28. P. 6526–6536.
- Mata N.L., Radu R.A., Clemmons R.C., Travis G.H.* Isomerization and oxidation of vitamin A in conedominant retinas: a novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight // *Neuron*. 2002. V. 36. P. 69–80.
- Merhi-Soussi F., Ange'nieux B., Canola K., Kostic C., Tekaya M., Hornfeld D., Arsenijevic Y.* High Yield of Cells Committed to the Photoreceptor Fate from Expanded Mouse Retinal Stem Cells // *Stem Cells*. 2006. V. 24. P. 2060–2070.
- Meyer J.S., Katz M.L., Maruniak J.A., Kirk M.D.* Embryonic Stem Cell-Derived Neural Progenitors Incorporate into Degenerating Retina and Enhance Survival of Host Photoreceptors // *Stem Cells*. 2006. V. 24. P. 274–283.
- Mimura T., Yamagami, S. Yokoo S., Araie M., Amano S.* Comparison of Rabbit Corneal Endothelial Cell Precursors in the Central and Peripheral Cornea // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2005. V. 46. P. 3645–3648.
- Moshiri A., Close J., Reh T.A.* Retinal stem cells and regeneration // *Int. J. Dev. Biol*. 2004. V. 48. P. 1003–1014.
- Morrow E.M., Furukawa T., Cepko C.L.* Vertebrate photoreceptor cell development and disease // *Trends in Cell Biology*. 1998. V. 8. P. 353–358.
- Neitz M., Neitz J.* Molecular Genetics of Color Vision and Color Vision Defects // *Arch Ophthalmol*. 2000. V. 118. P. 691–700.
- Nickerson P.E.B., Emsley J.G., Myers T., Clarke D.B.* Proliferation and Expression of Progenitor and Mature Retinal Phenotypes in the Adult Mammalian Ciliary Body after Retinal Ganglion Cell Injury // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2007. V. 48. P. 5266–5275.
- Ooto S., Akagi T., Kageyama R., Akita J., Mandai M., Honda Y., Takahashi M.* Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina // *PNAS*. 2004. V. 101. P. 13654–13659.
- Osakada F., Ooto S., Akagi T., Mandai M., Akaike A., Takahashi M.* Wnt Signaling Promotes Regeneration in the Retina of Adult Mammals // *J. Neuroscience*. 2007. V. 27. P. 4210–4219.
- Pang J.J., Chang B., Kumar A., Nusinowitz S., Noorwez S.M., Li J., Rani A., Foster T.C., Chiodo V.A., Doyle T., Li H., Malhotra R., Teusner J.T., McDowell J.H., Min S.H., Li Q., Kaushal S., Hauswirth W.W.* Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 Leber congenital amaurosis // *Mol. Ther*. 2006. V. 13. P. 565–572.
- Redmond T.M., Hamel C.P.* Genetic analysis of RPE65: from human disease to mouse model // *Meth. Enzymol*. 2000. V. 316. P. 705–724.

- Redmond T.M., Yu S., Lee E., Bok D., Hamasaki D., Chen N., Goletz P., Ma J.X., Crouch R.K., Pfeifer K.* Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle // *Nat. Genet.* 1998. V. 20. P. 344–351.
- Reh T.A.* Right timing for retina repair // *Nature.* 2006. V. 444. P. 156–157.
- Simonelli F., Ziviello C., Testa F., Rossi S., Fazzi E., Bianchi P.E., Fossarello M., Signorini S., Bertone C., Galantuomo S., Brancati F., Valente E.M., Ciccodicola A., Rinaldi E., Auricchio A., Banfi S.* Clinical and Molecular Genetics of Leber's Congenital Amaurosis: A Multicenter Study of Italian Patients // *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 2007. V. 48. P. 4284–4290.
- Song B.J., Tsang S.H., Lin C.-S.* Genetic models of retinal degeneration and targets for gene therapy // *Gene Therapy Molec. Biol.* 2007. V. 11. P. 229–262.
- Strettoi E., Pignatelli V., Rossi C., Porciatti V., Falsini B.* Remodeling of second-order neurons in the retina of rd/rd mutant mice // *Vision Res.* 2003. V. 43. P. 867–877.
- Sullivan R.K.P., WoldeMussie E., Pow D.V.* Dendritic and Synaptic Plasticity of Neurons in the Human Age-Related Macular Degeneration Retina // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007. V. 48. N 6. P. 2782–2791.
- Takahashi M.* Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue // *Nat. Neurosci.* 2001. V. 4. P. 1163–1164.
- Tomita M., Mori T., Maruyama K., Zahir T., Ward M., Umegawa A., Michael J., Young A.* Comparison of Neural Differentiation and Retinal Transplantation with Bone Marrow-Derived Cells and Retinal Progenitor Cells // *Stem Cells.* 2006. V. 24. P. 2270–2278.
- Tropepe V., Coles B.L.K., Chiasson B.J., Horsford D.J., Elia A.J., McInnes R.R., Kooy D. van der.* Retinal Stem Cells in the Adult Mammalian Eye // *Science.* 2000. V. 17. P. 2032–2036.
- Turner D.L., Cepko C.L.* A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development // *Nature.* 1987. V. 328. P. 131–136.
- Wang J.-S., Estevez M.E., Cornwall M.C., Kefalov V.J.* Intra-retinal visual cycle required for rapid and complete cone dark adaptation // *Nature Neurosci.* 2009. V. 12. P. 295–302.
- Warrington K.H. Jr., Herzog R.W.* Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer // *Hum. Genet.* 2006. V. 119. P. 571–603.
- Wolf G.* The Visual Cycle of the Cone Photoreceptors of the Retina // *Nutrition Reviews.* 2004. V. 62. P. 283–291.
- Young M.J.* Stem cells in the mammalian eye: a tool for retinal repair // *Apmis.* 2005. V. 113. N 11–12. P. 845–857.

## Recent advances in restoration of the visual function at retinal deficiencies in mammals

**E. Maximova**

*Institute for Information Transmission Problems  
(The Kharkevich Institute), RAS  
127994 Moscow, Bolshoi Karetny, 19*

In the last decade new data have been accumulated on the mechanisms of the development of the mammalian retina, stem cell biology, and genetic disorders underlying a number of congenital visual pathologies. A variety of approaches to therapy of some visual disorders have been developed using animal models. These fundamental advances allowed efficient therapy of the respective disorders in human.

*Key words:* mammalian retina, regeneration, retinal stem cells, Leber congenital amaurosis {LCA}, RPE65, gene therapy.