Обзоры литературы

УДК 617.7:576(048)

Результаты и возможные перспективы применения генетических технологий в офтальмологии (литературный обзор). Часть 2.

Н. А. Гаврилова, д-р мед. наук, профессор; **О. Е. Тищенко,** канд. мед. наук, доцент;
А. В. Зиновьева, старший лаборант

ФГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова;

Москва (Российская Федерация)

E-mail: aleksandra.r@live.ru

Ключевые слова: вирусные векторы, генная терапия, сетчатка

Появление принципиально новых технологических решений в области генной терапии на сегодняшний день и сформировавшийся приоритет развития генетических технологий создают серьезные предпосылки для начала новой Fusion эры в офтальмологии в ближайшее время. В данном обзоре, во второй его части, представлены результаты фундаментальных и клинических исследований применения генетических терапевтических стратегий – замены гена, подавления экспрессии генов, геномного редактирования с помощью технологии CRISPR/Cas9, которые используются в офтальмологии в течение последних нескольких лет.

Стратегия замены гена

В 2000 году Ali R.R. с соавт. была использована стратегия замены мутировавшего гена PRPH2 у мышей с аутосомно-доминантным пигментным ретинитом [1]. Ген PRPH2 кодирует белок периферин-2, участвует во взаимодействии клеток с внеклеточным матриксом и другими клетками, стабилизирует мембранные диски в наружном сегменте фоторецепторов сетчатки. Мутации в гене PRPH2 приводят к сбоям в формировании и расположении фоторецепторов и развитию целого ряда дегенеративных заболеваний сетчатки глаза – макулодистрофии, болезни Штаргардта, амавроза Лебера, белоточечной абиотрофии сетчатки. В результате субретинального введения AAV, несущего трансген PRPH2, были восстановлены структурная целостность и функции фоторецепторов, но в течение длительного времени, они не сохранялись.

Установлено, что у крыс RSC (Royal College of Surgeons of England – королевский колледж хирургов Англии) мутации гена MERTK приводят к нарушениям фагоцитоза наружных сегментов фоторецепторов пигментным эпителием сетчатки. Ген MERTK является членом MER/AXL/TYRO3 семейства киназных рецепторов и кодирует фермент MER–протоонкогенная тирозинпротеинкиназа. При субретинальном введении аденовирусной конструкции с геном MERTK у крыс RSC было выявлено восстановление фагоцитарной способности ПЭС в близлежащих от места введения зонах и отмечалась временная задержка дегенерации фоторецепторов [2]. В других исследованиях доставка гена MERTK производилась с использованием AAV [3] и LV [4]. Полученные результаты свидетельствовали о восстановлении фагоцитарной способности ПЭС, фоторецепторов и увеличении функциональной активности сетчатки (ЭРГ), которое сохранялось в течение 4 месяцев при использовании LV и 9 недель при использовании AAV2. Несколько исследований было проведено на моделях врожденного амавроза Лебера. В субретинальное пространство у мышей с нокаутом Rpe65–/– вводили rAAV.RPE65 для замены гена RPE65, что приводило к замедлению процессов дегенерации и функциональному восстановлению фоторецепторов. Аналогичное исследование было проведено с использованием (субретинальное введение) оптимизированного AAV (AAV2.RPE65), в результате у мышей было выявлено повышение функциональной активности сетчатки (ЭРГ) и остроты зрения, хотя оценка была ограничена только 3 месяцами, и никакой информации относительно дегенерации фоторецепторов не поступало [5]. Данные исследования положили начало для разработки в последующем препарата – Luxturna (Spark Therapeutics Inc, Филадельфия, Пенсильвания, США), см. первую часть обзора (№1, 2021).

С мутациями гена ABCA4 связана болезнь Штаргардта, форма аутосомно–рецессивной ювенильной макулярной дегенерации. Субретинальное введение вектора AAV2/5, с геном Abca4 приводило к снижению содержания липофусцина, улучшению морфологии и повышению функций сетчатки на срок до 5 месяцев [6].

© Гаврилова Н. А., Тищенко О. Е., Зиновьева А. В., 2021

Стратегия подавления экспрессии генов (сайленсинг генов от англ. gene silencing, или в частности, выключение гена)

Сайленсинг генов может происходить как на уровне транскрипции, так и на посттранскрипционном уровне. Сайленсинг генов на уровне транскрипции является результатом модификации гистонов, в гетерохроматине, которая приводит к тому, что соответствующие участки ДНК становятся недоступными для аппарата (РНК–полимераза) и факторов транскрипции. Сайленсинг генов на посттранскрипционном уровне является результатом разрушения (деградации) мРНК соответствующих генов. Разрушение мРНК препятствует трансляции и формированию продукта гена (полипептида, белка). Общий механизм посттранскрипционного сайленсинга генов – это путь РНК–интерференции (RNAi).

На сегодняшний день большой интерес представляет использование механизма РНК–интерференции (RNAi), позволяющей ингибировать экспрессию специфических генов. С этой целью используются различные антисмысловые ингибиторы – рибозимы, ингибиторы малых РНК (миРНК) и антисмысловые олигонуклеотиды.

Рибозимы

Рибозимы («головка молотка») (Rz) – небольшие по размеру каталитические РНК, обладающие высокой каталитической активностью и специфичностью. В последние годы был достигнут значительный прогресс в области создания рибозимов с улучшенными свойствами и применения их для ингибирования экспрессии генов.

Использовались рибозимы, селективно расщепляющие мутантную мРНК P23H и S334Ter, при аутосомно–доминантном пигментном ретините [7, 8], родопсина и периферина независимо от мутаций [9, 10].

Gorbatyuk M.S. с соавт. при субретинальном введении AAV2–Rz397 нокаутированным по родопсину гемизиготным (RHO +/–) мышам получили значительное (более 50%) снижение мРНК родопсина [11]. Этими же авторами было проведено еще одно исследование [12]. Рибозим Rz525, упакованный в капсид AAV5 (AAV5–Rz525), катализирующий мРНК родопсина собак, мышей и людей, но не крыс вводили субретинально трансгенным крысам P23H (экспрессия трансгенной мРНК мыши и крысы). ОТ–ПЦР–анализ показал уменьшение трансгенной (мышиной) мРНК RHO на 46% и отсутствие изменений в мРНК RHO крысы. Для того, чтобы одновременно блокировать мРНК RHO крысы (целесообразно при разных мутациях в одном и том же гене) в векторе AAV кроме рибозима Rz525 должен был быть размещен рибозим, катализирующий мРНК родопсина крыс, но в связи с тем, что это слишком большой объем, для данной стратегии это невозможно.

Малые интерферирующие РНК (siRNA)

Малые интерферирующие РНК (siRNA, small interfering RNA) представляют класс двухцепочечных РНК, длиной 20–25 нуклеотидов, угнетают экспрессию целевых генов и ингибируют синтез патологических белков [13, 14, 15].

На сегодняшний день использование механизма РНК–интерференции (RNAi), позволяющего ингибировать экспрессию специфических генов, представляет особенно большой интерес в лечении ретиноваскулярной патологии, проводятся клинические исследования. Компания «Pfizer» (США) завершила клиническое исследование MONET (фаза II), в котором были подтверждены безопасность и эффективность siRNA PF–04523655 у пациентов с неоваскулярной ВМД [16].

Антисенс–терапия с использованием антисмысловых олигонуклеотидов

Из множества способов генной терапии, доступных в настоящее время, определенный интерес представляет собой развивающееся в офтальмологии направление – антисенс–терапия с использованием антисмысловых олигонуклеотидов (antisense oligonucleotides – AON). Метод основан на ингибировании синтеза белка, участвующего в развитии заболевания, путем блокирования трансляции его мРНК с помощью комплементарных к ней коротких нуклеотидных последовательностей.

В последние годы проводятся многочисленные доклинические исследования применения лекарственных препаратов на основе AON при наследственных заболеваниях сетчатки, ретинобластоме, дистрофиях и неоваскуляризации роговицы [17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27], клинические исследования нескольких лекарственных препаратов на основе AON. Компания «Gene Signal» (Франция) завершила клинические испытания (фаза III) препарата GS–101 (Aganirsen) в форме глазных капель. Препарат представляет собой новый антисмысловой олигонуклеотид, который путем связывания мРНК ингибирует экспрессию рецептора инсулина (IRS–1), стимулирующего экспрессию фактора роста эндотелия сосудов–1 (VEGF–1). Рекомендован с целью предотвращения развития неоваскуляризации роговицы у пациентов после кератопластики и стромального кератита и для предотвращения формирования неоваскулярной глаукомы при ишемической окклюзии центральной вены сетчатки (исследование STRONG, фаза II/III) [28, 29]. Проводятся клинические исследования (фаза I) антисмыслового олигонуклеотида ISTH0036, ингибитора трансформирующего фактора роста бета 2 (TGF–β2). Пациентам с первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ) после антиглаукоматозной операции фильтрующего типа производится интравитреальная инъекция ISTH0036 [30].

Стратегия геномного редактирования с помощью CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 – стремительно развивающаяся технология редактирования генома, основанная на инструментах иммунной системы бактерий. В основе этой технологии – участки бактериальной ДНК под

Таблица 1. Сравнительная характеристика клинических исследований с использованием генной терапии в лечении офтальмологических заболеваний.

Препарат	Механизм действия	Разработчик	Путь введения	Фаза исследования / регистрационный номер (Clinicaltrials.gov)	Заболевание	Сведения
PF–04523655	siRNA	Pfizer	Интравитреальный	2 MONET NCT00713518	Неоваскулярная ВМД	Благоприятный профиль безопасности В группе с комбинированным лечением PF–04523655 1 мг и ранибизумабом 0,5 мг – большее повышение МКОЗ в сравнении с группой монотерапии ранибизумабом 0,5 мг (9,5 букв против 6,8 букв при p>0,5)
GS–101 (Aganirsen)	AON	Gene Signal	Местный	2/3 STRONG NCT02947867	Ишемическая окклюзия центральной вены сетчатки Неоваскулярная глаукома	Результаты не опубликованы
ISTH0036	AON	Isarna Therapeutics GmbH	Интравитреальный	1 NCT02406833	ПОУГ после трабекулэктомии	Благоприятный профиль безопасности После введения 67,5 мкг или 225 мкг STH0036 зарегистрированы постоянные значения ВГД <10 мм рт.ст. в течение трехмесячного периода послеоперационного наблюдения
AGN–151587 (EDIT–101)	CRISPR	Allergan	Субретинальный	1/2a NCT03872479	Амавроз Лебера	Результаты не опубликованы

Примечание. siRNA – малые интерферирующие РНК (small interfering RNA); AON – антисмысловые олигонуклеотиды (antisense oligonucleotides); CRISPR – участки бактериальной ДНК под названием «сгруппированные короткие палиндромные повторы» (clustered regularly interspaced short palindromic repeats); ВМД – возрастная макулярная дегенерация; ПОУГ – первичная открытоугольная глаукома; МКОЗ – максимально корригированная острота зрения

названием «сгруппированные короткие палиндромные повторы» (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR), между которыми располагаются фрагменты ДНК (спейсеры), которые несут в себе следы атаковавших бактерию вирусов, – что–то вроде картотеки нарушителей. При повторной атаке вируса бактерия распознает и уничтожает его с помощью Cas–белков, которые разрезают вирусную ДНК.

С 2013 г. начались исследования по редактированию генома в клетках с использованием этой системы. Дженнифер Дудна и Эммануэль Шарпантье показали, что можно искусственно синтезировать CRISPR РНК, в которой место определенного фрагмента ДНК занимает последовательность, выбранная исследователем. Белок Cas9 узнает и связывается с такой синтетической CRISPR РНК, и становится запрограммированным на узнавание и разрезание соответствующего ей места в ДНК. Такая система позволяет вырезать «патологический» участок генома и заменить его на «здоровый». При этом клетка не умирает от разрезания ДНК, так как вносятся исправления по здоровой копии из парной хромосомы за счет естественного процесса репарации ДНК.

С использованием системы редактирования генома CRISPR/Cas9 в офтальмологии в последние годы проведен целый ряд исследований. Разработаны но-

каутные модели животных с пигментным ретинитом, ретинобластомой [31, 32], стратегии генной терапии наследственных заболеваний – дистрофий роговицы, врожденного амавроза Лебера, пигментного ретинита, Х-сцепленного ретиношизиса, влажной формы возрастной макулярной дегенерации [33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44].

Особого внимания заслуживают исследования, проведенные с использованием технологии редактирования CRISPR/Cas9 для подавления экспрессии VEGF-A, блокады VEGF-R2 и ангиогенеза на экспериментальных моделях кислород-индуцированной ретинопатии и лазер-индуцированной хориоидальной неоваскуляризации [45, 46, 47]. Исследование с CRISPR/Cas9-опосредованной заменой генов в возбудителе грибкового кератита (Fusarium Solani Var. Petroliphilum) позволяет допустить возможность использования геномного редактирования при персистирующей инфекции глазной поверхности [48].

Барьером на пути к широкому применению редактирования генома in vivo является безопасная система доставки эндонуклеаз CRISPR/Cas. При использовании аденоассоциированного вируса (AAV) для доставки эндонуклеаз конструкция CRISPR/Cas может оставаться в течение длительного периода времени в клетке, мешать работе клетки и провоцировать иммунные реакции.

Yang T. с соавт. использовали модифицированные наноалмазы в качестве носителей CRISPR–Cas9 для "внедрения" мутации в ген RS1, вследствие чего сетчатки мышей приобрели патологические черты, типичные для Х-сцепленного ретиношизиса (XLRS) [49]. Li F. с соавт. разработали саморазрушающуюся систему CRISPR/Cas («камикадзе»), которая, по мнению авторов, несмотря на временный характер компонентов систем доставки и редактирования, является эффективным и надежным инструментом для редактирования ретинального генома [50].

Еще одним ограничением применения систем CRISPR является размер эндонуклеазы Cas9. Наиболее широко используемый вариант Cas9, полученный из Streptococcus pyogenes (SpCas9), слишком большой для упаковки с компонентами рРНК в одном AAV, это требует двухвекторных систем, которые имеют более низкую эффективность. В настоящее время разрабатываются варианты получения Cas9 из золотистого стафилококка (SaCas9) и Campylobacter jejuni (CjCas9), меньших по размеру.

Наиболее серьезным ограничением является вероятность нецелевых мутаций, которые могут быть инициированы системами CRISPR. Schaefer K.A. с соавт. при использовании CRISPR-Cas9 для коррекции мутации гена Pde6b у мышей с дегенерацией сетчатки rd1, обнаружили более тысячи нецелевых мутаций [51].

В 2019 г. в США начались клинические испытания CRISPR–терапии у пациентов с амаврозом Лебера.

Классическая простая система CRISPR–Cas9 редактирования, как оказалось, не всегда бывает безупречной – исправления могут быть неточными и, соответственно, есть риск нецелевых эффектов. В связи с этим, технология геномного редактирования продолжает развиваться – основная задача исключить нецелевые эффекты.

Новые технологии геномного редактирования – праймированное, транспозонное («прыгающие гены» – транспозоны) и генетический «шредер».

Технология праймированного геномного редактирования.

К никазе Cas9 добавлены два новых компонента – обратная транскриптаза и специальная гидовая РНК (pegRNA) – получился так называемый праймирующий редактор (prime editor), который разрезает только одну нить ДНК и снижает риск ошибок [52].

ДНК–транспозоны – «прыгающие гены» используют для своих перемещений механизм cut and paste (вырезать и вставить).

В процессе считывания (транскрипции) формируется молекула РНК, в рибосоме по ее «инструкции» строится фермент транспозаза, который, возвращаясь в ядро, двигается вдоль ДНК, находит свой ДНК – транспозон и вырезает его. Вырезанный транспозон переносится в подготовленную брешь целевой ДНК, а исходная ДНК сшивается.

При субретинальном введении трансфецированных клеток ПЭС с помощью транспозонной системы "Спящая красавица" на модели лазер–индуцированной хориоидальной неоваскуляризации выявлено увеличение экспрессии фактора пигментного эпителия (PEDF) и уменьшение площади неоваскуляризации.

Заключение

Таким образом, генная терапия с использованием современных терапевтических стратегий (подавление экспрессии генов с использованием механизма РНК–интерференции, антисмысловых олигонуклеотидов, геномного редактирования CRISPR–Cas9 и, особенно новых технологий – праймированного и транспозонного редактирования) на сегодняшний день имеет широкие возможности и высокий потенциал для использования в офтальмологии.

Литература

1. **Ali R.R., Sarra G.M., Stephens C. et al.** Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy // Nat Genet. –2000. – Vol.25(3). – P.306-310.
2. **Vollrath D., Feng W., Duncan J.L. et al.** Correction of the retinal dystrophy phenotype of the RCS rat by viral gene transfer of Mertk // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2001. – Vol. 98(22). – 12584-12589.
3. **Smith A.J., Schlichtenbrede F.C., Tschernutter M.** AAV–Mediated gene transfer slows photoreceptor loss in the RCS rat model of retinitis pigmentosa // Mol Ther. –2003. – Vol.8(2). – P.188-195.

4. **Tschernutter M., Schlichtenbrede F.C., Howe S.** Long-term preservation of retinal function in the RCS rat model of retinitis pigmentosa following lentivirus-mediated gene therapy // Gene Ther. – 2005. – Vol. 12(8). Tschernutter M., Schlichtenbrede F.C., Howe S. Long-term preservation of retinal P.12694–12701.
5. **Bennicelli J., Wright J.F., Komaromy A., Jacobs J.B., Hauck B. et al.** Reversal of blindness in animal models of leber congenital amaurosis using optimized AAV2–mediated gene transfer // Mol Ther. – 2008. – Vol.16(3). – P.458-465.
6. **Allocca M., Doria M., Petrillo M. et al.** Serotype–dependent packaging of large genes in adeno–associated viral vectors results in effective gene delivery in mice // J Clin Invest. – 2008. – Vol.118(5). – P.1955-1964.
7. **Drenser K.A., Timmers A.M., Hauswirth W.W., Lewin A.S.** Ribozyme–targeted destruction of RNA associated with autosomal–dominant retinitis pigmentosa 5 // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 1998. – Vol.39. – P.681–689.
8. **Lewin A.S., Drenser K.A., Hauswirth W.W. et al.** Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa 4 // Nat Med. – 1998. – №4. – P.967–971.
9. **O'Neill B., Millington–Ward S., O'Reilly M. et al.** Ribozyme–based therapeutic approaches for autosomal dominant retinitis pigmentosa // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2000. – Vol.41(10). – P.2863-2869.
10. **Sullivan J.M., Pietras K.M., Shin B.J., Misasi J.N.** Hammerhead ribozymes designed to cleave all human rod opsin mRNAs which cause autosomal dominant retinitis pigmentosa 1 // Mol Vis. – 2002. – Vol.8. – P.102–113.
11. **Gorbatyuk M.S., Pang J.J, Thomas J. Jr., Hauswirth W.W., Lewin A.S.** Knockdown of wild–type mouse rhodopsin using an AAV vectored ribozyme as part of an RNA replacement approach // MolVis. – 2005. – Vol.11. – P.648–656.
12. **Gorbatyuk M., Justilien V., Liu J., Hauswirth W.W., Lewin A.S.** Preservation of photoreceptor morphology and function in P23H rats using an allele independent ribozyme // Exp Eye Res. – 2007. – Vol.84(1). – P.44-52.
13. **Corydon T.J.** Antiangiogenic Eye Gene Therapy // Human Gene Therapy. –2015. – Vol.26(8). – P.525–537.
14. **Garba A.O., Mousa S.A.** Bevasiranib for the treatment of wet, age–related macular degeneration // Ophthalmol Eye Dis. – 2010. – Vol.2. – P.75–83.
15. **Guzman–Aranguez A., Loma P., Pintor J.** Small–interfering RNAs (siRNAs) as a promising tool for ocular therapy // Br J Pharmacol. – 2013. – Vol.170(4). – P.730–747.
16. **Nguyen Q.D., Schachar R.A., Nduaka C.I.** MONET Clinical Study Group. Evaluation of the siRNA PF–04523655 versus ranibizumab for the treatment of neovascular age–related macular degeneration (MONET Study) // Ophthalmology. – 2012. – Vol.119(9). – P.1867–1873.
17. **Chau V.Q., Hu J., Gong X., Hulleman J.D.** Delivery of Antisense Oligonucleotides to the Cornea // Nucleic Acid Therapeutics. – 2020. – Vol.10. – 1089/nat.2019.0838.
18. **Cideciyan A.V., Jacobson S.G., Drack A.V. et al.** Effect of an intravitreal antisense oligonucleotide on vision in Leber congenital amaurosis due to a photoreceptor cilium defect // Nat Med. – 2019. – Vol.25(2). – P.225–228.
19. **Collin R.W., Garanto A.** Applications of antisense oligonucleotides for the treatment of inherited retinal diseases // Curr Opin Ophthalmol. – 2017. – Vol.28(3). – P.260–266.
20. **Gerard X., Garanto A., Rozet J.M., Collin R.W.** Antisense Oligonucleotide Therapy for Inherited Retinal Dystrophies // Adv Exp Med Biol. – 2016. – Vol.854. – P.517-524.
21. **Hu J., Rong Z., Gong X. et al.** Oligonucleotides targeting TCF4 triplet repeat expansion inhibit RNA foci and mis–splicing in Fuchs' dystrophy // Hum Mol Genet. – 2018. – Vol.27(6). – P.1015–1026.
22. **Hu J., Shen X., Rigo F., Prakash T.P. et al.** Duplex RNAs and ss–siRNAs Block RNA Foci Associated with Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy // Nucleic Acid Ther. – 2019. – Vol.29(2). – P.73-81.
23. **Moore S.M., Skowronska–Krawczyk D., Chao D.L.** Emerging Concepts for RNA Therapeutics for Inherited Retinal Disease // Adv Exp Med Biol. – 2019. – Vol.1185. – P.85-89.
24. **Rocha E.M., Nominato L.F., Reinach P.S**. Re: Cursiefen et al. Aganirsen antisense oligonucleotide eye drops inhibit keratitis–induced corneal neovascularization and reduce need for transplantation: the I–CAN study // Ophthalmology. –2015. – Vol.122(5). – e28.
25. **Sangermano R., Garanto A., Khan M. et al.** Deep-intronic ABCA4 variants explain missing heritability in Stargardt disease and allow correction of splice defects by antisense oligonucleotides // Genet Med. – 2019. – Vol.21(8). – P.1751–1760.
26. **Yang G., Fu Y., Zhang L., Lu X., Li Q.** miR106b regulates retinoblastoma Y79 cells through Runx3 // Oncol Rep. – 2017. – Vol.38(5). – P.3039–3043.
27. **Zarouchlioti C., Sanchez–Pintado B., Hafford Tear N.J. et al.** Antisense Therapy for a Common Corneal Dystrophy Ameliorates TCF4 Repeat Expansion-Mediated Toxicity // Am J Hum Genet. – 2018. – Vol.102(4). – P.528–539.
28. **Cursiefen C., Viaud E., Bock F. et al.** Aganirsen antisense oligonucleotide eye drops inhibit keratitis–induced corneal neovascularization and reduce need for transplantation: the I-CAN study // Ophthalmology. – 2014. – Vol.121(9). – P.1683-1692.
29. **Lorenz K., Scheller Y., Bell K. et al.** A prospective, randomised, placebo–controlled, double–masked, three–armed, multicentre phase II/III trial for the Study of a Topical Treatment of Ischaemic Central Retinal Vein Occlusion to Prevent Neovascular Glaucoma – the STRONG study: study protocol for a randomised contolled trial // Trials. – 2017. – Vol.18(1). – P.128.
30. **Pfeiffer N., Voykov B., Renieri G. et al.** First–in–human phase I study of ISTH0036, an antisense oligonucleotide selectively targeting transforming growth factor beta 2 (TGF–β2), in subjects with open–angle glaucoma undergoing glaucoma filtration surgery // PLoS One. – 2017. – Vol.12(11). – e0188899.
31. **Naert T., Colpaert R., Van Nieuwenhuysen T. et al.** CRISPR/Cas9 mediated knockout of rb1 and rbl1 leads to rapid and penetrant retinoblastoma development in Xenopus tropicalis // Sci Rep. – 2016. – Vol.6. – P.35264.
32. **Wu W.H., Tsai Y.T., Justus S., Lee T.T. et al.** CRISPR Repair Reveals Causative Mutation in a Preclinical Model of Retinitis Pigmentosa // Mol Ther. –2016. – Vol.24(8). – P.1388–94.
33. **Bakondi B., Lv W., Lu B. et al.** In Vivo CRISPR/Cas9 Gene Editing Corrects Retinal Dystrophy in the S334ter–3 Rat Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa // Mol Ther. – 2016. – Vol.24(3). – P.556-563.

34. **Burnight E.R., Giacalone J.C., Cooke J.A. et al.** CRISPR–Cas9 genome engineering: Treating inherited retinal degeneration // Prog Retin Eye Res. –2018. – Vol.65. – P.28-49.
35. **Huang K.C., Wang M.L., Chen S.J. et al.** Morphological and Molecular Defects in Human Three–Dimensional Retinal Organoid Model of X–Linked Juvenile Retinoschisis // Stem Cell Reports. – 2019. – Vol.13(5). – P.906–923.
36. **Kim E.K., Kim S., Maeng Y.S.** Generation of TGFBI knockout ABCG2+/ABCB5+ double–positive limbal epithelial stem cells by CRISPR/Cas9–mediated genome editing // PLoS One. – 2019. – Vol.14(2). – e0211864.
37. **Kim K., Park S.W., Kim J.H. et al.** Genome surgery using Cas9 ribonucleoproteins for the treatment of age–related macular degeneration // Genome Res. –2017. – Vol.27(3). – P.419-426.
38. **Peddle C.F., MacLaren R.E.** The Application of CRISPR/Cas9 for the Treatment of Retinal Diseases // Yale J Biol Med. – 2017. – Vol.90(4). – P.533-541.
39. **Ruan G.X., Barry E., Yu D. et al.** CRISPR/Cas9–Mediated Genome Editing as a Therapeutic Approach for Leber Congenital Amaurosis 10 // Mol Ther. – 2017. – Vol.25(2). – P.331-341.
40. **Suzuki K., Tsunekawa Y., Hernandez–Benitez R. et al**. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology–independent targeted integration // Nature. –2016. – Vol.540(7631). – P.144-149.
41. **Taketani Y., Kitamoto K., Sakisaka T. et a**l. Repair of the TGFBI gene in human corneal keratocytes derived from a granular corneal dystrophy patient via CRISPR/Cas9–induced homology–directed repair // Sci Rep. – 2017. – Vol.7(1), – P.16713.
42. **Xu C.L., Park K.S., Tsang S.H.** CRISPR/Cas9 genome surgery for retinal diseases // Drug Discov Today Technol. – 2018. – Vol.28. – P.23-32.
43. **Yu W., Mookherjee S., Chaitankar V. et al.** Nrl knockdown by AAV–delivered CRISPR/Cas9 prevents retinal degeneration in mice // Nat Commun. – 2017. – Vol.8. – P.14716.
44. **Zhu J., Ming C., Fu X., Duan Y. et al**. Gene and mutation independent therapy via CRISPR–Cas9 mediated cellular reprogramming in rod photoreceptors // Cell Res. – 2017. – Vol.27. – P.830–833.
45. **Chung S.H., Mollhoff I.N., Nguyen U. et al.** Factors Impacting Efficacy of AAV–Mediated CRISPR–Based Genome Editing for Treatment of Choroidal Neovascularization // Mol Ther Methods Clin Dev. – 2020. – Vol.17. – P.409-417.
46. **Huang X., Zhou G., Wu W. et al.** Genome editing abrogates angiogenesis in vivo // Nat Commun. – 2017. – Vol.8(1). – P.112.
47. **Yiu G., Tieu E., Nguyen A.T., Wong B., Smit-McBride Z.** Genomic Disruption of VEGF–A Expression in Human Retinal Pigment Epithelial Cells Using CRISPR–Cas9 Endonuclease // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2016. – Vol.57(13). – P.5490–5497.
48. **Lightfoot J.D., Fuller K.K.** CRISPR/Cas9–Mediated Gene Replacement in the Fungal Keratitis Pathogen Fusarium solani var. petroliphilum // *Microorganisms.* –2019. – Vol.7(10). – P.457.
49. **Yang T.C., Chang C.Y., Yarmishyn A.A. et al**. Carboxylated nanodiamond–mediated CRISPR–Cas9 delivery of human retinoschisis mutation into human iPSCs and mouse retina // Acta Biomater. – 2020. – Vol.101. – P.484–494.
50. **Li F., Hung S.S.C., Mohd Khalid M.K.N. et al.** Utility of Self–Destructing CRISPR/Cas Constructs for Targeted Gene Editing in the Retina // Hum Gene Ther. – 2019. – Vol.30(11). – P.1349-1360.
51. **Schaefer K.A., Wu W.H., Colgan D.F. et al.** Unexpected mutations after CRISPR–Cas9 editing in vivo // Nat Methods. – 2017. – Vol.14(6). – P.547-548.
52. **Anzalone A.V., Randolph P.B., Davis J.R. et a**l. Search–and–replace genome editing without double–strand breaks or donor DNA // Nature. – 2019. – Vol.576(7785). – P.149–157.
53. **Hernandez M., Recalde S., Garcia-Garcia L. et al.** Preclinical Evaluation of a Cell–Based Gene Therapy Using the Sleeping Beauty Transposon System in Choroidal Neovascularization // Mol Ther Methods Clin Dev. – 2019, – Vol.15. – P.403–417.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, которые могли бы повлиять на их мнение относительно предмета или материалов, описанных и обсуждаемых в данной рукописи.

Поступила 10.07.20

Результати та можливі перспективи застосування генетичних технологій в офтальмології. Частина 2.

Гаврилова Н. А., Тищенко О. Е., Зинов'єва А. В.

ФГБОУ ВО Московський державний медико-стоматологічний університет ім. А. І. Євдокимова; Москва (Російська Федерація)

Поява принципово нових технологічних рішень в області генної терапії на сьогоднішній день і сформування пріоритету розвитку генетичних технологій створюють серйозні передумови для початку нової Fusion ери в офтальмології найближчим часом.
В даному огляді, у другій його частині, представлені результати фундаментальних і клінічних досліджень застосування генетичних терапевтичних стратегій - заміни гена, пригнічення експресії генів, геномного редагування за допомогою технології CRISPR / Cas9, які використовуються в офтальмології протягом останніх кількох років.

Ключові слова: *вірусні вектори, генна терапія, сітківка*