

Использование магнитных частиц для фиксации изолированных клеток при субретинальной трансплантации

А.А. Темнов¹, Ю.А. Белый², С.А. Миргородская³, А.Д. Семенов³, А.В. Шацких³,
А.В. Ревещин⁴, Г.В. Павлова⁴, Н.Н. Куст⁴, А.Н. Склифас⁵

¹ ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», Москва

² Калужский филиал ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова», Калуга

³ ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова», Москва

⁴ ФГБУН Институт биологии гена Российской академии наук, Москва

⁵ ФГБУН Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пущино

Контакты: Андрей Александрович Темнов, aa-temnov@yandex.ru

Цель: данное исследование посвящено разработке метода введения магнитных микрочастиц в цитоплазму клеток с их последующей фиксацией под сетчаткой глаза посредством магнитного имплантата.

Материал и методы. Магнитные частицы ($d = 2,8 \text{ мкм}$), обработанные плурониками, вводили в цитоплазму клеток линии НЕК-293, экспрессирующих GFP. Под общей анестезией с помощью устройства для локального субретинального дозированного введения клетки НЕК-293, содержащие магнитные частицы, вводили субретинально в глаз кролика (96 глаз, 48 кроликов). В опытной группе (48 глаз, 24 кролика) для удержания трансплантированных клеток эписклерально фиксировали магнитный имплантат. В группе контроля (48 глаз, 24 кролика) магнитный имплантат не фиксировали. После проведения хирургических вмешательств в заданные сроки (1-е, 3-и, 7-е, 14-е, 21-е и 30-е сутки) всем животным производили биомикроскопию и офтальмоскопию с фоторегистрацией, ультразвуковое исследование, компьютерную томографию и последующее морфологическое исследование.

Результаты. Введение магнитных частиц в цитоплазму клеток линии НЕК-293 не оказывает влияния на жизнеспособность клеток. Клетки НЕК-293, содержащие магнитные частицы, остаются в зоне введения под действием магнитного поля эписклерально фиксированного имплантата в течение 21 суток. Такие же клетки, введенные без последующей фиксации магнитного имплантата, находятся в зоне введения не более 3 суток.

Выводы: использование клеток, содержащих магнитные частицы, при фиксации магнитного имплантата может быть перспективным методом клеточной терапии для лечения заболеваний сетчатки.

Ключевые слова: НЕК-293, магнитные частицы, плуроники.

Using of magnetic particles for fixing of isolated cells in subretinal transplantation

A.A. Temnov¹, Yu.A. Belyy², S.A. Mirgorodskaya³, A.D. Semenov³, A.V. Shatskikh³,
A.V. Revishchin⁴, G.V. Pavlova⁴, N.N. Kust⁴, A.N. Sklifas⁵

¹ N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of Moscow Healthcare Department, Moscow

² «The Interbranch Scientific-Technical Complex «Eye microsurgery» named after academician Fedorov» of the Ministry of Health of Russia, Kaluga

³ «The Interbranch Scientific-Technical Complex «Eye microsurgery» named after academician Fedorov» of the Ministry of Health of Russia, Moscow

⁴ Institute of gene biology of Russian Academy of Sciences, Moscow

⁵ Institute of cell biophysics Russian Academy of Sciences, Pushchino

Purpose: This study focuses on the development of the method of introduction of magnetic microparticles in the cytoplasm of HEK-293 cell line with their subsequent fixation under the retina of the eye.

Materials and Methods. Magnetic particles ($d = 2,8 \text{ mm}$) were treated with pluronic and injected into the cytoplasm of HEK-293 cell line, expressing GFP. The surgery was made under general anesthesia. HEK-293 containing magnetic

particles were injected into the subretinal space of rabbit eyes (eyes 96, 48 rabbits) using original dosing device. In the experimental group (48 eyes, 24 rabbits) we fixed episcleral magnetic implant to hold cells in local place. In the control group (48 eyes, 24 rabbit) magnetic implant was not fixed. After the surgery all animals were examined using biomicroscopy, ophthalmoscopy with photographic recording, ultrasound, computed tomography and morphological study in certain terms (1, 3, 5, 7, 14, 21 day and 1 month).

Results: The introduction of the magnetic particles into the cytoplasm of HEK 293 cell line has no effect on cell viability. HEK-293 containing magnetic particles remains in the place of injection during 21 days in rabbit eyes, where the magnetic implants were fixed (in control group during 3 days).

Conclusions: Using of cells containing magnetic particles with fixation of the magnetic implant can be a promising method for cell therapy for the treatment of retinal diseases.

Key words: HEK-293, magnetic particles, plurionics.

Введение

Патология сетчатки является одной из ведущих причин слабовидения и слепоты в мире. К такой патологии относятся посттравматические и воспалительные заболевания, гипертоническая ангиопатия сетчатки, посттромботическая ретинопатия, возрастные макулярные дегенерации, диабетическая ретинопатия и наследственные заболевания.

Одним из перспективных методов лечения заболеваний сетчатки является клеточная и генная терапия.

Изначально на модели животных было показано, что темп нейродегенерации в глазу может быть замедлен при местном введении в патологически измененную ткань нейротрофических, антиапоптотических цитокинов и факторов роста [1–4]. Однако эти белки обладают коротким дистантным свойством и подвергаются быстрой инактивации ферментными системами организма, что исключает их системное введение. Для пролонгирования терапевтического действия нейротрофических факторов и цитокинов необходимо субретинальное введение генетических или клеточных конструкций, осуществляющих продукцию белковых молекул непосредственно в пораженной ткани [5–11].

Представляется перспективным использование стволовых или прогениторных клеток, трансфицированных генетическими конструкциями и продуцирующих нейротрофические факторы [12–21].

Данные клетки могут быть трансфицированы генетическими конструкциями и использованы для введения в патологический очаг [22, 23].

Однако эффект клеточной терапии при лечении патологии сетчатки резко снижается из-за того, что трансплантированные клетки, давая homing-эффект, мигрируют из зоны введения в привычное для себя микроокружение.

В настоящее время популярным направлением становится применение магнитных технологий с целью направленной доставки клеточного материала и его возможной фиксации. Впервые с этой целью клетки, содержащие магнитные наночастицы, были использованы для движения клеток при внутривенном введении в область печени [24, 25]. Затем стволовые клетки с магнитными наночастицами были применены для их продвижения к месту повреждения сосудов и сердца [26, 27]. Однако в эксперименте *in vitro* к 24 часам жизнеспособность клеток, меченных по указанной авторами технологии, составляла лишь 30%.

В 2012 году Yanai et al. доказали возможность использования магнитных наночастиц для направленной доставки стволовых клеток в область сетчатки, но авторы не ставили перед собой цели длительной фиксации трансплантированного материала в зоне введения [28].

В настоящей работе исследована возможность введения магнитных микрочастиц в цитоплазму клеток линии HEK-293 с целью удержания их в месте введения под сетчаткой глаза с помощью магнитного имплантата, закрепленного на наружной поверхности глаза. Клетки линии HEK-293 (human embryonic kidney) использованы в экспериментах вследствие того, что они легко поддаются трансфекции как маркерных, так и потенциально терапевтических генов.

Таким образом, разработка метода, позволяющего получать функционально активные и жизнеспособные клетки, содержащие магнитные частицы для локальной фиксации в зоне введения, является перспективным и многообещающим направлением в генной и клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний сетчатки.

Цель работы

Разработать технологию фиксации клеток, меченных магнитными микрочастицами, при

субретинальном введении и экспериментально обосновать ее эффективность.

Материал и методы

Характеристика клеточного материала, маркировка клеток

В работе использована линия стволовых клеток НЕК-293/GFP (human embryonic kidneys), полученная из клеток почки эмбриона человека («Биолот», Санкт-Петербург, Россия).

Для культивирования НЕК-293 применяли среду DMEM (ПанЭко, Россия) при добавлении 10% фетальной сыворотки крови (Perbio NuClone, США), L-глутамин (ПанЭко, Россия) и 4% гентамицина (ПанЭко, Россия). Культуру клеток инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе. Клетки росли на площади 25 см² во флаконах («Costar»). По мере нарастания культуры клеток почек эмбриона человека НЕК-293 до концентрации 1,5 × 10⁵ кл./мл они подвергались трансфекции полученными конструкциями: EGFP-N1 («Clontech»). Трансфекцию осуществляли с помощью реагента ExGene 500 (Fermentas, R0511), согласно протоколу. Селекцию клонов, несущих встроенную конструкцию, проводили с помощью реагента – антибиотика гиницитина (G418, Invitrogen # 15750045) в течение 10 суток. После селекции с применением антибиотика клоны, устойчивые к G418, были использованы для анализа с помощью микроскопа (Olympus). Все колонии были GFP-позитивными. Клетки были рассеяны на 3 см чашки Петри («Corning») в количестве около 300 000. Через 24 часа были добавлены магнитные частицы Dynabeads M-280 («Invitrogen»), обработанные поверхностно-активными веществами-плюрониками в соотношении 1 : 100. Комбинация клеток НЕК/GFP с магнитными частицами культивировалась 24 часа при температуре 37°C в CO₂-инкубаторе. Через 24 часа трансгенная культура по гену GFP с магнитными частицами была 5-кратно промыта раствором Хенкса (ПанЭко, Россия) и обработана раствором трипсина (ПанЭко, Россия).

Следующим этапом с помощью метода МТТ-теста произведена оценка влияния магнитных частиц на пролиферативную активность и гибель клеточной линии почек эмбрионов НЕК-293.

Исследование взаимодействия внутриклеточных магнитных частиц и магнитного имплантата

Для оценки эффективности воздействия внутриклеточных магнитных частиц и внешнего

эписклерального имплантата было проведено исследование в эксперименте in vitro. Для этого в чашку Петри, содержащую клетки с магнитными частицами, погружали полимерный эластичный магнитный имплантат (ПЭМИ) оригинальной конструкции, круглой формы, диаметром 4 мм, толщиной 0,35 мм. При помощи микроскопа (Olympus) производили оценку прикрепления клеток на внешний магнитный имплантат, а также фоторегистрацию результатов.

Исследования на животных

Исследования in vivo выполнены на 96 глазах 48 кроликов породы шиншилла в возрасте 6 месяцев, массой тела от 2,5 до 3,5 кг. Все правые глаза были опытными (48 глаз), а левые (48 глаз) – контролем. Животным в оба глаза за 30 минут до операции в конъюнктивальную полость инстиллировали 1–2 капли 1% раствора атропина и 10% мезатона для достижения медикаментозного миозина. Операцию проводили под общим наркозом (внутримышечным введением 1% раствора гексенала из расчета 0,5 мл/кг), руководствуясь принципами гуманного отношения к животным. Общее обезболивание дополняли 3-кратной инстилляцией в конъюнктивальную полость 0,4% раствора инокаина.

В опытных глазах (48 глаз) после установки блефаростата, отступя 3 мм от лимба, с помощью конъюнктивальных ножниц в нижнем сегменте производили разрез конъюнктивы и тенонной оболочки протяженностью 10 мм. Далее выделяли нижнюю прямую мышцу, брали ее на шов-держалку. Затем в 7 мм от лимба подшивали комплекс ПЭМИ толщиной 0,35 мм, диаметром 4 мм, напряженностью магнитного поля 5,0 мТл с лазерным зондом. В 3 мм от лимба в верхнем и верхненаружном сегменте устанавливали три порта 25 Ga в проекции плоской части цилиарного тела, фиксировали инфузионную систему, световод, витреотом, производили срединную витрэктомию. Суспензию клеток объемом 0,02 мл, содержащую около 6000 клеток, меченных магнитными частицами, вводили субретинально при помощи разработанного устройства для дозирования с иглой 25G, на конце которой расположена изогнутая канюля 41G с заточенным нижним краем. Для предотвращения движения клеток через ретиномическое отверстие сразу после их введения в витреальную полость вводили газоздушную смесь в количестве 0,3–0,4 мл. По завершении эксперимента лазерный зонд обрезали на уровне ПЭМИ. На склеротомические отвер-

ствия и конъюнктиву накладывали шов Coated Vicryl 8-0 (Ethicon).

В контрольные глаза (48 глаз) осуществляли субретинально хирургическое введение клеток, содержащих магнитные частицы, без фиксации полимерного эластичного магнитного имплантата.

Животных выводили из эксперимента через 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 суток и 1 месяц после операции под общим наркозом путем воздушной эмболии. При выполнении исследования соблюдались правила биоэтики, утвержденные Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977, а также принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского общества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации о защите позвоночных животных, используемых для лабораторных и иных целей. Последующим этапом были произведены гистологические исследования энуклеированных глазных яблок. Глазные яблоки энуклеировали, вскрывали переднюю камеру, глаза фиксировали с помощью погружения в раствор 4% формальдегида в фосфатном буфере (PBS pH-7,3) в течение 24 часов при температуре 4°C. Затем глаза пропитывали в 30% растворе сахаразы в PBS также 24 часа при 4°C и замораживали при температуре -24°C, после чего изготавливали срезы толщиной 40 мкм с помощью криотома фирмы Leica (CM 1510S). Срезы анализировали с помощью микроскопа Olympus IX81 в режиме УФ-флюоресценции, оптимальной для зеленого флюоресцентного белка (GFP) при увеличении объектива $\times 4$, $\times 10$, $\times 20$. Трансплантированные НЕК-293/GFP-клетки выделялись яркой зеленой флюоресценцией на фоне слабой желтоватой автофлюоресценции окружающих тканей.

Результаты

Результаты оценки пролиферативной активности и жизнеспособности стволовых клеток, меченных магнитными частицами

При проведении световой микроскопии на микроскопе Olympus была осуществлена оценка эффективности введения магнитных частиц в клетки НЕК-293/GFP. На представленных фотографиях (рис. 1) видно, что магнитные частицы располагаются в цитоплазме, а не на поверхности клеток.

По данным, полученным в результате проведения МТТ-теста, было показано, что проникновение магнитных частиц внутрь цитоплазмы незначительно (5-8% - в течение 24 часов, до 15% - через 72 часа инкубации) снижает жизнеспособность клеток.



Рис. 1. Культура стволовых клеток. Световая микроскопия. Различная глубина фокусировки демонстрирует, что магнитные частицы располагаются в цитоплазме. Увеличение $\times 60$

Результаты оценки эффективности взаимодействия внутриклеточных магнитных частиц и магнитного имплантата

По результатам оценки прямого взаимодействия клеток и магнитного имплантата было отмечено, что клетки прикрепляются и прочно удерживаются на поверхности магнитного имплантата в течение 1 часа.



Рис. 2. Прикрепление клеток, содержащих магнитные частицы в цитоплазме, к поверхности магнитного имплантата с индукцией магнитного поля 5 мТл. Световая микроскопия (А). Микроскопия в режиме УФ-флюоресценции, оптимальной для визуализации GFP (Б). Увеличение $\times 4$

Результаты исследования на животных Биомикроскопия. В сроки наблюдения 1-3 суток в группах опыта и контроля была отмечена инъекция сосудов глазного яблока в зоне проведения хирургического вмешательства, которая проходила к сроку 5 суток, во все последующие сроки швы конъюнктивы и склеротомических отверстий были адаптированы, оптические среды прозрачны, воспалительных признаков не выявлено.

Офтальмоскопия. В сроки наблюдения 1 сутки во всех глазах опытной и контрольной групп визуализировалась локальная отслойка сетчатки в зоне введения клеток, дефект сетчатки и сосудистой оболочки в зоне введения (рис. 3А). К 3-м суткам отслойка сетчатки не определялась, но дефект сетчатки и сосудистой оболочки сохранялся (рис. 3Б). В дальнейшие сроки наблюдения было сложно визуализировать место локального введения клеток (рис. 3В).

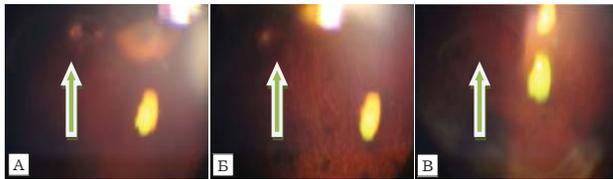


Рис. 3. Офтальмоскопия. Опыт: 1-е сутки (А), 3-и сутки (Б), 7-е сутки (В)

Ультразвуковое исследование показало, что во всех глазах опытной и контрольной групп на 1-е сутки визуализировалась локальная отслойка сетчатки – $h =$ от 1,4 мм до 1,0 (рис. 4А), которая к 3-м суткам уменьшалась до $h =$ от 0,7 мм до 0,4 (рис. 4Б), а к 5-м суткам отслойка сетчатки не определялась (рис. 4В). Во все сроки наблюдения в обеих группах визуализировалась мелкодисперсная взвесь в стекловидном теле, а в опытной группе – эхо-тень от магнита.

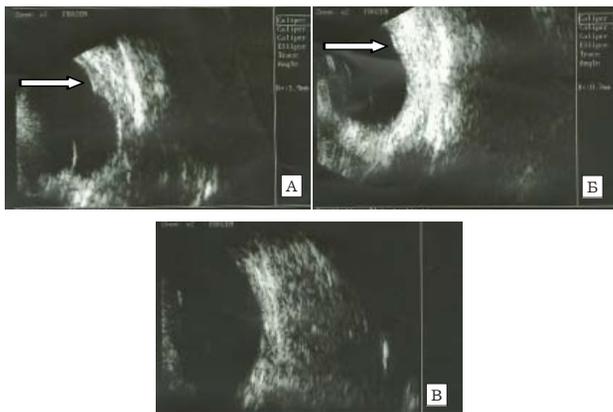


Рис. 4. Ультразвуковое исследование. Опыт: 1-е сутки (А), 3-и сутки (Б), 5-е сутки (В)

Компьютерная томография во всех случаях выявляла расположение ПЭМИ в правом ретробульбарном пространстве в нижнелатеральном квадранте, левые орбиты были интактны, патологических очагов не отмечено.

По данным морфологического исследования криосрезов энуклеированных глазных яблок, в 1-е сутки во всех 6 опытных глазах клетки НЕК-293/GFP располагались в месте их введения под сетчаткой, а в стекловидном теле и других структурах глаза обнаружены не были (рис. 5). Во всех 6 контрольных глазах были обнаружены единичные или группы клеток НЕК-293/GFP в полости стекловидного тела, не связанные с другими структурами глаза (рис. 6).

На 3-и сутки после введения во всех 6 опытных глазах клетки НЕК-293/GFP располагались

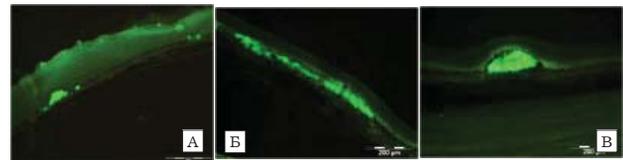


Рис. 5. Микроскопия в режиме УФ-флюоресценции, оптимальной для визуализации GFP. Увеличение $\times 4$ (А), $\times 10$ (Б, В). Опыт: 1-е сутки, клетки НЕК-293/GFP под сетчаткой

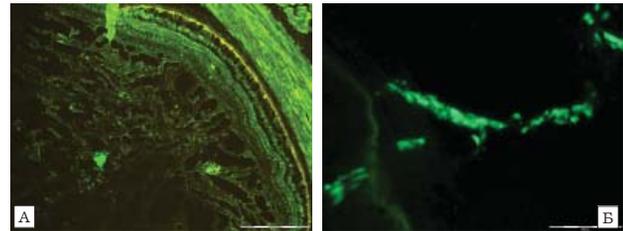


Рис. 6. Микроскопия в режиме УФ-флюоресценции, оптимальной для визуализации GFP. Увеличение $\times 4$ (А), $\times 10$ (Б). Контроль: 1-е сутки, клетки НЕК-293/GFP в полости стекловидного тела

также в месте введения под сетчаткой (рис. 7). Внешний вид трансплантированных клеток, а также их ядер, окрашенных бисбензимином, свидетельствует о том, что по крайней мере большинство из них было живо в момент фиксации формальдегидом (рис. 7Б). В 3 контрольных глазах из 6 в полости стекловидного тела были обнаружены скопления клеток НЕК-293/GFP, не связанные с другими структурами глаза, в остальных 3 глазах они не выявлены (рис. 8).

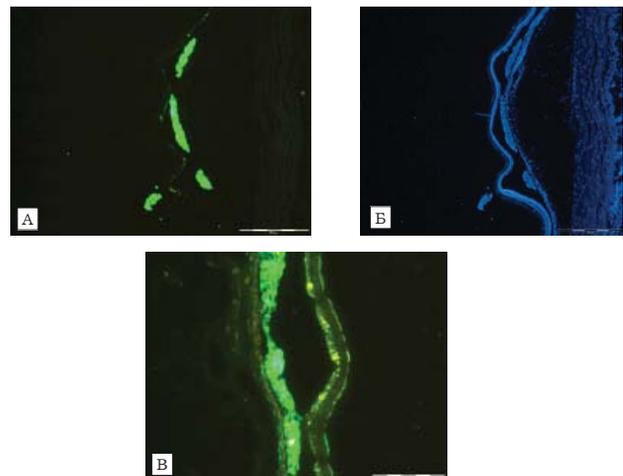


Рис. 7. Микроскопия в режиме УФ-флюоресценции, оптимальной для визуализации GFP. Увеличение $\times 4$ (А, Б), $\times 10$ (В). Опыт: 3-и сутки, окраска среза бисбензимином для визуализации ядер живых клеток (Б); группы клеток НЕК-293/GFP, расположенных субретинально

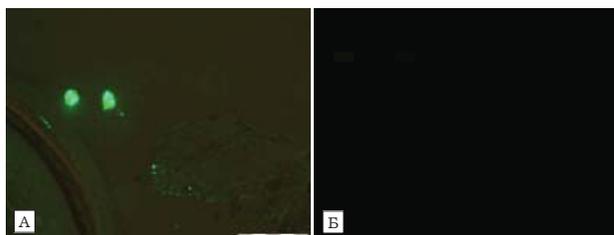


Рис. 8. Микроскопия в режиме УФ-флюоресценции, оптимальной для визуализации GFP. Увеличение $\times 4$ (А), $\times 10$ (Б). Контроль: 3-и сутки, клетки HEK-293/GFP в полости стекловидного тела

Спустя 5, 7, 10, 14, 21 сутки после введения клеток в опытных глазах клетки HEK-293/GFP также располагались в месте их введения, но их количество снижалось на каждом последующем сроке наблюдения (рис. 9). К сроку 1 месяц клетки обнаружить не удалось ни в одном случае, во всех 6 глазах имела место пресклеральная автофлюоресценция в зоне подшивания ПЭМИ (рис. 10). В контрольных глазах начиная с 5-х суток клетки не визуализировались.

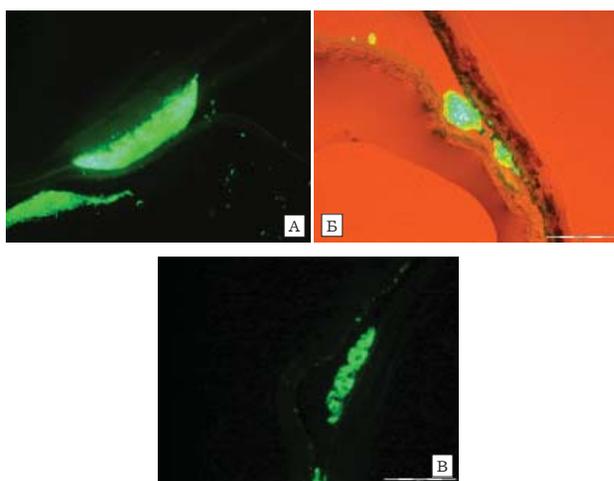


Рис. 9. Микроскопия в режиме УФ-флюоресценции, оптимальной для визуализации GFP (А, В), УФ + проходящий свет (Б). Увеличение $\times 4$. Опыт: 5-е сутки (А), 14-е сутки (Б), 21-е сутки (В), клетки HEK-293/GFP расположены субретинально

Обсуждение

В настоящее время особую актуальность для лечения нейродегенеративных заболеваний сетчатки приобретает генная терапия [7, 9]. Для доставки генных и белковых конструкций чаще всего используют вирусные факторы, однако инъекция вирусных конструкций в ткань глаза может вызывать активацию клеточного звена

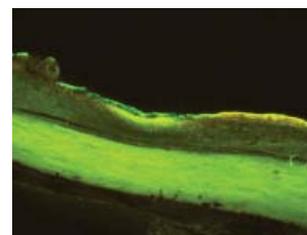


Рис. 10. Микроскопия в режиме УФ-флюоресценции, оптимальной для визуализации GFP. Увеличение $\times 10$. Опыт: 1 месяц. Флюоресценция в месте фиксации ПЭМИ (указано стрелкой)

иммунитета, местную воспалительную реакцию, инактивацию генной конструкции, что приведет к резкому сокращению времени продукции трофических факторов [8, 9, 29–31]. В настоящее время многими исследователями стали использоваться клетки как контейнеры для доставки генных конструкций [12–18, 20, 21]. Серьезным препятствием для применения клеточной терапии в офтальмологии является так называемый homing-эффект – интенсивная миграция субретинально введенных клеток из места введения. В результате такой миграции существенно ослабляется терапевтический эффект введенных клеток. В настоящее время разрабатываются магнитные технологии, имеющие целью направленную доставку трансплантируемого клеточного материала в заданную область и его фиксацию там [24–27]. В офтальмологии подобные технологии были исследованы пока лишь для направленной доставки клеток [28]. Поэтому актуальным вопросом является разработка технологии фиксации клеточного материала в зоне его локальной трансплантации при помощи магнитных технологий и с наименьшей травматизацией тканей во время операции.

В настоящей работе мы использовали клеточную линию HEK-293 в связи с доступностью материала, легкостью культивирования и возможностью провести трансфекцию GFP-плазмидой, что позволяло визуализировать трансплантированные клетки на криосрезах глаза с помощью флюоресцентной микроскопии [22, 23]. Мы также показали безопасность и эффективность технологии насыщения этой культуры магнитными частицами. Впервые была достигнута 95% жизнеспособность клеток при использовании магнитных микрочастиц.

Для введения клеточной суспензии в субретинальное пространство нами было разработано специальное устройство, которое обеспечивало деликатное введение клеток с минимальной трав-

матизацией окружающих тканей и возможностью точного дозирования вводимой суспензии.

Для интраоперационной диафаноскопии с целью точного определения места и последующего контролируемого локального введения стволовых клеток мы использовали полимерный эластичный магнитный имплантат с лазерным зондом оригинальной конструкции. Мы также модифицировали хирургический способ введения клеток субретинально, проводя срединную витрэктомию и заполняя витреальную полость после введения клеток газовой смесью, что позволило нам избежать выхода клеток из субретинального пространства в полость стекловидного тела.

Заключение

В результате проведенных клинических исследований доказано, что предложенная методика является малоинвазивной. При введении клеток, содержащих магнитные частицы, не наблюдалось воспалительных явлений и интраоперационных осложнений. Состояние сетчатки в зоне введения клеток восстанавливалось к 3-м суткам послеоперационного периода. Данные морфологического исследования демонстрируют, что предложенная методика позволяет осуществить фиксацию изолированных клеток в месте их локального введения в сроки до 21 суток, что в 7 раз превышало показатели в группе контроля. Это открывает возможности для изучения механизмов воздействия стволовых клеток на очаг повреждения, разработки новых перспективных стратегий в офтальмологии, а также открыть новые возможности для нейропротекции.

Работа частично поддержана грантом РФФ № 14-15-00942.

Литература

1. Chaum, E. Retinal neuroprotection by growth factors: a mechanistic perspective / E. Chaum // *J. Cell Biochem.* – 2003 – Vol. 88, N.1. – P. 57–75.
2. Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light / M.M. LaVail, K. Unoki, D. Yasumura [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1992 – Vol. 89, N.23. – P. 11249–11253.
3. Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations / M.M. LaVail, D. Yasumura, M.T. Mathes [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1998. – Vol. 39, N.3. – P. 592–602.
4. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration / A. Wenzel, C. Grimm, M. Samardzija [et al.] // *Prog. Ret. Eye Res.* – 2005. – Vol. 24, N.2. – P. 275–306.
5. Bennett, J. Gene therapy for retinitis pigmentosa / J. Bennett // *Curr. Opin. Mol. Ther.* – 2000. – Vol. 2, N.4. – P. 420–425.
6. Borrás, T. Recent developments in ocular gene therapy / T. Borrás // *Exp. Eye Res.* – 2003. – Vol. 76, N.6. – P. 643–652.
7. Hauswirth, W. Retinal Gene Therapy 1998: Summary of a Workshop / W. Hauswirth, R. McInnes // *Mol. Vis.* – 1998. – Vol.4. – P.11.
8. Hermens, W.T. Viral vectors, tools for gene transfer in the nervous system / W.T. Hermens, J. Verhaagen // *Prog. Neurobiol.* – 1998. – Vol. 55, N.4. – P. 399–432.
9. Isenmann, S. How to keep injured CNS neurons viable – strategies for neuroprotection and gene transfer to retinal ganglion cells / S. Isenmann, C. Schmeer, A. Kretz // *Mol. Cell Neurosci.* – 2004. – Vol. 26, N.1. – P. 1–16.
10. Martin, K.R. Gene delivery to the eye using adeno-associated viral vectors / K.R. Martin, R.L. Klein, H.A. Quigley // *Methods.* – 2002. – Vol. 28, N.2. – P. 267–275.
11. Surace, E.M. Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer / E.M. Surace, A. Auricchio // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2003. – Vol. 22, N.6. – P. 705–719.
12. Aramant, R.B. Progress in retinal sheet transplantation / R.B. Aramant, M.J. Seiler // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2005. – Vol. 23, N.5. – P. 474–494.
13. Retinal incorporation and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells / E. Banin, A. Obolensky, M. Idelson [et al.] // *Stem Cells.* – 2006. – Vol. 24, N.2. – P. 246–257.
14. Crystallin- β -b2-overexpressing NPCs support the survival of injured retinal ganglion cells and photoreceptors in rats / M.R. Böhm, S. Pfrommer, C. Chiwitt [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2012. – Vol. 53, N.13. – P. 8265–8279.
15. Cramer, A.O. Translating induced pluripotent stem cells from bench to bedside: application to retinal diseases / A.O. Cramer, R.E. McLaren // *Curr. Gene Ther.* – 2013. – Vol. 13, N.2. – P. 139–151.
16. Das, A.M. Stem cell therapy for retinal degeneration: retinal neurons from heterologous sources / A.M. Das, X. Zhao, I. Ahmad // *Semin. Ophthalmol.* – 2005. – Vol. 20, N.1. – P. 3–10.
17. Generation of Rx⁺/Pax6⁺ neural retinal precursors from embryonic stem cells / H. Ikeda, F. Osakada, K. Watanabe [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2005. – Vol. 102, N.32. – P. 11331–11336.
18. Klassen, H. Stem cells and retinal repair / H. Klassen, D.S. Sakaguchi, M.J. Young // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2004. – Vol. 23, N.2. – P. 149–181.
19. Availability of pre- and pro-regions of transgenic GDNF affects the ability to induce axonal sprout growth / N. Kust, D. Pantelev, I. Mertsalov [et al.] // *Mol Neurobiol.* – 2014. – [Epub ahead of print].
20. Cell transplantation as a treatment for retinal disease / R.D. Lund, A.S. Kwan, D.J. Keegan [et al.] // *Prog. Retin. Eye Res.* – 2001. – Vol. 20, N.4. – P. 415–449.
21. Retinal transplantation: progress and problems in clinical application / R.D. Lund, S.J. Ono, D.J. Keegan, J.M. Lawrence // *J. Leukoc. Biol.* – 2003. – Vol. 74, N.2. – P. 151–160.
22. Control of small inhibitory RNA levels and RNA interference by doxycycline induced activation of a minimal RNA polymerase III promoter / Amar L., Desclaux M., Faucon-Biguot N. [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – Vol. 34, N.5. – P. 37.
23. The linoleic acid derivative DCP-LA selectively activates PKC-epsilon, possibly binding to the phosphatidylserine binding site / T. Kanno, H. Yamamoto, T. Yaguchi [et al.] // *J. Lipid Res.* – 2006. – Vol.47, N.6. – P. 1146–1156.
24. In vivo trafficking and targeted delivery of magnetically labeled stem cells / A.S. Arbab, E.K. Jordan, L.B. Wilson [et al.] // *Hum Gene Ther.* – 2004. – Vol. 15, N.4. – P. 351–360.
25. Using a neodymium magnet to target delivery of ferumoxide-labeled human neural stem cells in a rat model of focal cerebral ischemia / M. Song, Y.J. Kim, Y.H. Kim [et al.] // *Hum. Gene Ther.* – 2010. – Vol. 21, N.5. – P. 603–610.
26. Magnetic tagging increases delivery of circulating progenitors in vascular injury / P.G. Kyrtatos, P. Lehtolainen, M. Junemann-Ramirez [et al.] // *JACC Cardiovasc. Interv.* – 2009. – Vol. 2, N. 8. – P. 794–802.
27. Thickness sensing of hMSCs on collagen gel directs stem cell fate / W.S. Leong, C.Y. Tay, H. Yu [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2010. – Vol. 401, N.2. – P. 287–292.
28. Focused magnetic stem cell targeting to the retina using superparamagnetic iron oxide nanoparticles / A. Yanai, U.O. Häfeli, A.L. Metcalfe [et al.] // *Cell Transplant.* – 2012. – Vol. 21, N.6. – P. 1137–1148.
29. Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor prevents death and increases responsiveness of rod photoreceptors in the retinal degeneration slow mouse / M. Cayouette, D. Behn, M. Sendtner [et al.] // *J. Neurosci.* – 1998. – Vol. 18, N.22. – P. 9282–9293.
30. Hoffman, L.M. Cell-mediated immune response and stability of intraocular transgene expression after adenovirus-mediated delivery / L.M. Hoffman, A.M. Maguire, J. Bennett // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1997. – Vol. 38, N.11. – P. 2224–2233.
31. Immune responses limit adenovirally mediated gene expression in the adult mouse eye / M.B. Reichel, R.R. Ali, A.J. Thrasher [et al.] // *Gene Ther.* – 1998. – Vol. 5, N.8. – P. 1038–1046.

References

1. Chaum E. Retinal neuroprotection by growth factors: a mechanistic perspective. *J. Cell Biochem.* 2003; 88 (1): 57–75.
2. LaVail M.M., Unoki K., Yasumura D., [et al.]. Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992; 89 (23): 11249–11253.
3. LaVail M.M., Yasumura D., Matthes M.T., [et al.]. Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998; 39 (3): 592–602.
4. Wenzel A., Grimm C., Samardzija M., [et al.]. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog. Ret. Eye Res.* 2005; 24 (2): 275–306.
5. Bennett J. Gene therapy for retinitis pigmentosa. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2000; 2 (4): 420–425.
6. Borrás T. Recent developments in ocular gene therapy. *Exp. Eye Res.* 2003; 76 (6): 643–652.
7. Hauswirth W., McInnes R. Retinal Gene Therapy 1998: Summary of a Workshop. *Mol. Vis.* 1998; 4: 11.
8. Hermens W.T., Verhaagen J. Viral vectors, tools for gene transfer in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 1998; 55 (4): 399–432.
9. Isenmann S., Schmeer C., Kretz A. How to keep injured CNS neurons viable – strategies for neuroprotection and gene transfer to retinal ganglion cells. *Mol. Cell Neurosci.* 2004; 26 (1): 1–16.
10. Martin K.R., Klein R.L., Quigley H.A. Gene delivery to the eye using adeno-associated viral vectors. *Methods.* 2002; 28 (2): 267–275.
11. Surace E.M., Auricchio A. Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer. *Prog. Retin. Eye Res.* 2003; 22 (6): 705–719.
12. Aramant R.B., Seiler M.J. Progress in retinal sheet transplantation. *Prog. Retin. Eye Res.* 2005; 23 (5): 474–494.
13. Banin E., Obolensky A., Idelson M., [et al.]. Retinal incorporation and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2006; 24 (2): 246–257.
14. Böhm M.R., Pfrommer S., Chiwitt C., [et al.]. Crystallin- β 2-overexpressing NPCs support the survival of injured retinal ganglion cells and photoreceptors in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012; 53 (13): 8265–8279.
15. Cramer A.O., McLaren R.E. Translating induced pluripotent stem cells from bench to bedside: application to retinal diseases. *Curr. Gene Ther.* 2013; 13 (2): 139–151.
16. Das A.M., Zhao X., Ahmad I. Stem cell therapy for retinal degeneration: retinal neurons from heterologous sources. *Semin. Ophthalmol.* 2005; 20 (1): 3–10.
17. Ikeda H., Osakada F., Watanabe K., [et al.]. Generation of Rx+/Pax6+ neural retinal precursors from embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005; 102 (32): 11331–11336.
18. Klassen H., Sakaguchi D.S., Young M.J. Stem cells and retinal repair. *Prog. Retin. Eye Res.* 2004; 23 (2): 149–181.
19. Kust N., Panteleev D., Mertsalov I., [et al.]. Availability of pre- and pro-regions of transgenic GDNF affects the ability to induce axonal sprout growth. *Mol. Neurobiol.* 2014. [Epub ahead of print].
20. Lund R.D., Kwan A.S., Keegan D.J., [et al.]. Cell transplantation as a treatment for retinal disease. *Prog. Retin. Eye Res.* 2001; 20 (4): 415–449.
21. Lund R.D., Ono S.J., Keegan D.J., Lawrence J.M. Retinal transplantation: progress and problems in clinical application. *J. Leukoc. Biol.* 2003; 74 (2): 151–160.
22. Amar L., Desclaux M., Faucon-Biguot N., [et al.]. Control of small inhibitory RNA levels and RNA interference by doxycycline induced activation of a minimal RNA polymerase III promoter. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34 (5): 37.
23. Kanno T., Yamamoto H., Yaguchi T., [et al.]. The linoleic acid derivative DCP-LA selectively activates PKC-epsilon, possibly binding to the phosphatidylserine binding site. *J. Lipid Res.* 2006; 47 (6): 1146–1156.
24. Arbab A.S., Jordan E.K., Wilson L.B., [et al.]. In vivo trafficking and targeted delivery of magnetically labeled stem cells. *Hum Gene Ther.* 2004; 15 (4): 351–360.
25. Song M., Kim Y.J., Kim Y.H., [et al.]. Using a neodymium magnet to target delivery of ferumoxide-labeled human neural stem cells in a rat model of focal cerebral ischemia. *Hum. Gene Ther.* 2010; 21 (5): 603–610.
26. Kyrtafos P.G., Lehtolainen P., Junemann-Ramirez M., [et al.]. Magnetic tagging increases delivery of circulating progenitors in vascular injury. *JACC Cardiovasc. Interv.* 2009; 2 (8): 794–802.
27. Leong W.S., Tay C.Y., Yu H., [et al.]. Thickness sensing of hMSCs on collagen gel directs stem cell fate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010; 401 (2): 287–292.
28. Yanai A., Häfeli U.O., Metcalfe A.L., [et al.]. Focused magnetic stem cell targeting to the retina using superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Cell Transplant.* 2012; 21 (6): 1137–1148.
29. Cayouette M., Behn D., Sendtner M., [et al.]. Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor prevents death and increases responsiveness of rod photoreceptors in the retinal degeneration slow mouse. *J. Neurosci.* 1998; 18 (22): 9282–9293.
30. Hoffman L.M., Maguire A.M., Bennett J. Cell-mediated immune response and stability of intraocular transgene expression after adenovirus-mediated delivery. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1997; 38 (11): 2224–2233.
31. Reichel M.B., Ali R.R., Thrasher A.J., [et al.]. Immune responses limit adenovirally mediated gene expression in the adult mouse eye. *Gene Ther.* 1998; 5 (8): 1038–1046.