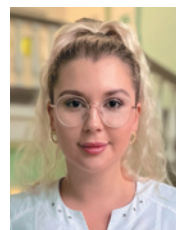


Клинико-иммунологический анализ трансплантации ретинального пигментного эпителия, полученного из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, в условиях фармакологической иммуносупрессии у кроликов

Н.В. Нероева¹Н.В. Балацкая¹А.Г. Бриллиантова¹Л.А. Катаргина¹А.Е. Харитонов², М.А. Лагарькова², А.Н. Богомазова²

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения Российской Федерации ул. Садовая-Черногрозская, 14/19, Москва, 105062, Российская Федерация

² ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина» Федерального медико-биологического агентства ул. Малая Пироговская, 1а, Москва, 119435, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ

Офтальмология. 2024;21(1):193–204

Обоснование исследования. Дегенеративные заболевания сетчатки, связанные с повреждением ретинального пигментного эпителия, не имеют лечения и приводят к необратимой потере зрения. Наиболее перспективным подходом в настоящее время считается трансплантация ретинального пигментного эпителия, дифференцированного из плюрипотентных стволовых клеток (ПСК-РПЭ). При испытании биомедицинских клеточных продуктов особые требования предъявляются к модели, которая должна имитировать патологические изменения, подобные таковым у человека, обладать достаточной иммунологической толерантностью к ксеногенным человеческим клеткам и позволять им полноценно функционировать. С этой целью используются линии иммуномодифицированных или иммунодефицитных животных, как правило, мелких грызунов (крыс и мышей), однако малый размер и особенности строения их глаз не позволяют осуществлять манипуляции, выполняемые при витреоретинальных вмешательствах у человека. Альтернативным способом предотвращения реакции отторжения ксенотрансплантата у крупных моделей представляется фармакологическая иммуносупрессия, в условиях которой трансплантированные ПСК-РПЭ могут проявить свое биологическое действие. Однако целенаправленные исследования эффективности трансплантации ПСК-РПЭ с применением иммуносупрессивной терапии в нашей стране не проводились, а данные немногочисленных зарубежных работ, посвященных этой проблеме, противоречивы. **Цель:** изучение иммунологической реактивности при трансплантации ИПСК-РПЭ в условиях комбинированной иммуносупрессивной терапии в эксперименте на кроликах. **Материалы и методы.** Исследование выполнено на 27 кроликах-самцах породы новозеландский альбинос, из них 24 животным проведена субретинальная трансплантация индуцированных плюрипотентных стволовых клеток ретинального пигментного эпителия: в I группе (12 глаз) вмешательство выполнялось в здоровый глаз; во II группе (12 глаз) — в область предварительно моделированной атрофии ретинального пигментного эпителия. Реципиенты получали комбинированную иммуносупрессивную терапию. Группой контроля служили 3 интактных кролика (6 глаз). Сроки наблюдения составили 14, 28 и 60 суток. Оценку посттрансплантационного процесса проводили с помощью стандартных и специализированных офтальмологических методов обследования. Определение цитокинов иммунного ответа IL-2, IL-6, иммуносупрессивных факторов TGF- β 1, TGF- β 2, TSP-1 в сыворотке крови и стекловидном теле выполняли методом твердофазного иммуноферментного анализа. **Результаты.** Комплексный анализ данных биомикроскопии, офтальмоскопии, оптической когерентной томографии, иммунологических исследований не выявил признаков активного воспаления; отсутствие локального и системного повышения концентрации острофазного IL-6, падение уровня IL-2 в сыворотке крови указывали на прямые эффекты используемой в настоящем исследовании комбинации иммуносупрессивных препаратов. **Заключение.** Применение комбинированной иммуносупрессивной терапии позволило предотвратить отторжение ксеногенного материала у кроликов и получить доказательства безопасности субретинальной трансплантации суспензии ИПСК-РПЭ как в здоровом глазу, так и в глазу с предварительно индуцированной атрофией пигментного эпителия.



Ключевые слова: ретинальный пигментный эпителий, атрофия, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, трансплантация, иммунореактивность, цитокины, иммуносупрессия

Для цитирования: Нероева Н.В., Балацкая Н.В., Бриллиантова А.Г., Катаргина Л.А., Харитонов А.Е., Лагарькова М.А., Богомазова А.Н. Клинико-иммунологический анализ трансплантации ретинального пигментного эпителия, полученного из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, в условиях фармакологической иммуносупрессии у кроликов. *Офтальмология*. 2024;21(1):193–204. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2024-1-193-204>

Прозрачность финансовой деятельности: никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов отсутствует.

Clinical and Immunological Analysis of Retinal Pigment Epithelium Transplantation Derived from Induced Pluripotent Stem Cells under Pharmacological Immunosuppression in Rabbits

N.V. Neroeva¹, N.V. Balatskaya¹, A.G. Brilliantova, L.A. Katargina¹, A.E. Kharitonov²,
M.A. Lagarkova², A.N. Bogomazova²

¹ Helmholtz National Medical Research Eye Diseases Center
Sadovaya-Chernogryazskaya str., 14/19, Moscow, 105062, Russian Federation

² Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine
of Federal Medical and Biological Agency
Malaya Pirogovskaya str., 1a, Moscow, 119435, Russian Federation

ABSTRACT

Ophthalmology in Russia. 2024;21(1):193–204

Research justification. Degenerative retinal diseases associated with retinal pigment epithelium damage are untreated and lead to irreversible vision loss. The most promising approach nowadays is considered to be the transplantation of retinal pigment epithelium differentiated from pluripotent stem cells (PSC-RPE). When testing biomedical cellular products, special requirements are placed on the animal model, which should simulate pathological changes, such as in humans, and have sufficient immunological tolerance to xenogenic human cells, enabling them to function fully. For this purpose, lines of immuno-modified or immunodeficiency animals are used, usually small rodents (rats and mice), but the small size and structure of their eyes do not allow manipulation in vitreoretinal interventions in humans. An alternative method of preventing xenotransplantation rejection in large models is pharmacological immunosuppression, under which transplanted PSC-RPE may have biological effects. However, targeted studies of the effectiveness of PSC-RPE transplantation with use of immunosuppressive therapy have not been conducted in our country, and the data of a few foreign works devoted to this problem are controversial. **Purpose.** Study of immunological reactivity in transplantation of IPSC-RPE under combined immunosuppressive therapy in rabbit experiment. **Materials and methods.** The study was performed on 27 male rabbits of New Zealand albino breed, of which 24 animals underwent subretinal transplantation of induced pluripotent stem cells of retinal pigment epithelium: in the I group (12 eyes) intervention was performed in the healthy eye; in group II (12 eyes) — in the area of pre-modeled atrophy of retinal pigment epithelium. Recipients were given combined immunosuppressive therapy. Control Group — 3 intact rabbits (6 eyes). The observation period was 14, 28 and 60 days. Post-transplant evaluation was carried out using standard and specialized ophthalmological examination methods. The determination of cytokines of the immune response IL-2, IL-6, immunosuppressive factors TGF- β 1, TGF- β 2, TSP-1 in the serum of the blood and the vitreous body was performed by solid-phase immunosurgical enzyme analysis. **Results.** Comprehensive analysis of biomicroscopy, ophthalmoscopy, optical coherent tomography, immunological studies revealed no signs of active inflammation; no local and systemic increase in the concentration of acute phase IL-6, a drop in serum IL-2 levels indicated direct effects of immunosuppressive drug combinations used in this study. **Conclusion.** The use of combined immunosuppressive therapy prevented rejection of xenogenic material in rabbits and obtained evidence of safety of subretinal transplantation of IPSC-RPE suspension both in the healthy eye, and pre-induced atrophy of pigmentary epithelium. **Keywords:** retinal pigment epithelium, atrophy, induced pluripotent stem cells, transplantation, immunoreactivity, cytokine, immunosuppression

For citation: Neroeva N.V., Balatskaya N.V., Brilliantova A.G., Katargina L.A., Kharitonov A.E., Lagarkova M.A., Bogomazova A.N. Clinical and Immunological Analysis of Retinal Pigment Epithelium Transplantation Derived from Induced Pluripotent Stem Cells under Pharmacological Immunosuppression in Rabbits. *Ophthalmology in Russia*. 2024;21(1):193–204. <https://doi.org/10.18008/1816-5095-2024-1-193-204>

Financial disclosure: none of the authors have a financial interest in the materials or methods presented.

There is no conflict of interests.

ВВЕДЕНИЕ

Ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) представляет собой монослой пигментированных клеток гексагональной формы, соединенных плотными контактами.

РПЭ выполняет ряд важных функций для поддержания полноценной работы сетчатки, включая регуляцию ее метаболизма, участие в процессах зрительного цикла, поглощение рассеянного света, формирование наружного гематоретинального барьера, обеспечивающего иммунологическую изоляцию нейтральной ткани.

По данным Wong и соавт., более 200 миллионов человек имеют значительное снижение остроты зрения вследствие патологии РПЭ, что подчеркивает его ключевое значение в реализации зрительной трансдукции [1].

Поражение РПЭ лежит в основе патогенеза дегенеративно-дистрофических заболеваний, таких как болезнь Штаргардта, пигментный ретинит и в особенности возрастная макулярная дегенерация (ВМД), которая до настоящего времени остается ведущей причиной слепоты и слабовидения у людей старше 60 лет во всем мире [2].

На ВМД приходится 8,7 % всех случаев слепоты, и ее распространенность, вероятно, будет возрастать вследствие экспоненциального старения населения [3].

Варианты терапии поздних стадий ВМД ограничены и представлены антиангиогенными препаратами, направленными на борьбу с хориоидальной неоваскуляризацией при «влажной» форме заболевания. Эффективного метода лечения географической атрофии (ГА) не существует; так как клетки РПЭ не обладают способностью к регенерации.

Прогресс клеточной биологии и стремительное развитие витреоретинальной хирургии способствовали поиску новых методов лечения заболеваний, связанных с дегенерацией РПЭ. Наиболее перспективным подходом для замены поврежденных элементов сетчатки представляется заместительная трансплантация плюрипотентных стволовых клеток (эмбриональных стволовых клеток (ЭСК)), индуцированных плюрипотентными клетками (ИПСК), дифференцированными в РПЭ. По мнению отечественных и зарубежных авторов, данное направление способно существенно улучшить зрительные функции пациентов [4–6].

Однако согласно Федеральному закону № 180 «О биомедицинских клеточных технологиях» от 23 июня 2016 г. использование ЭСК, как и фетальных клеток, в качестве биомедицинского клеточного продукта (БМКП) недопустимо.

Таким образом, единственным источником получения РПЭ для заместительной терапии тяжелых дегенеративных заболеваний сетчатки в Российской Федерации могут служить аутологичные или аллогенные линии ИПСК, которые по своим морфофункциональным свойствам подобны ЭСК [6].

Известно, что субретинальное пространство (СРП), как и передняя камера глаза, является иммунологически

привилегированной областью с секрецией клетками РПЭ факторов, ограничивающих миграцию лейкоцитов в сетчатку и обеспечивающих иммуносупрессивную активность интраокулярных жидкостных сред, что создает, по мнению ряда авторов, относительно безопасные условия для трансплантации ИПСК [7–9].

Противовоспалительные свойства ИПСК-РПЭ, как отмечает S. Sugita, также могут способствовать повышению совместимости донорского материала в среде реципиента [10].

Еще в 1993 г. L.Q. Jiang и соавт. продемонстрировали, что при трансплантации в СРП у здоровых животных ткань аллогенной неонатальной сетчатки способна к длительному выживанию и дифференцировке [11]. Однако, несмотря на высокую жизнеспособность, от 30 до 50 % материала ИПСК-РПЭ, трансплантируемого в СРП реципиента, по данным D.S. Rajendran Nair и соавт., подвергается деструкции и погибает [12]. Субретинальная трансплантация ксеногенных СК вызывает тяжелое воспаление в заднем отрезке глаза и отторжение донорского материала у экспериментальных животных в отсутствие иммуносупрессии [13].

При исследовании эффективности и безопасности клеточной терапии большое внимание уделяется адекватной модели животного, которая должна отвечать как минимум следующим требованиям: имитировать патологические изменения в сетчатке, подобные таковым у человека, обладать достаточной иммунологической толерантностью к ксеногенным человеческим клеткам, позволяющей в полной мере оценить эффективность и безопасность лечения. В настоящее время для предотвращения иммунного ответа на клеточную трансплантацию активно используют линии иммуномодифицированных/гуманизированных животных, как правило, крыс и мышей [14]. Следует отметить, что особенности строения и размеры глаза мелких грызунов не позволяют осуществлять манипуляции, выполняемые при витреоретинальных вмешательствах у человека [15], а крупные иммунодефицитные модели с большим глазным яблоком не разработаны. Альтернативным способом предотвращения реакции отторжения ксенотрансплантата в данном случае представляется фармакологическая иммуносупрессия, в условиях которой трансплантированные ИПСК-РПЭ могут проявлять свое биологическое действие. Однако целенаправленные исследования эффективности трансплантации ИПСК-РПЭ с применением иммуносупрессивной терапии до настоящего времени в нашей стране не проводились, а данные немногочисленных зарубежных работ, посвященных этой проблеме, противоречивы.

При внедрении метода заместительной клеточной терапии в офтальмологическую клинику важно учитывать, что патологический процесс в СРП (например, хроническое вялотекущее воспаление при атрофической форме ВМД) снижает иммуносупрессивную активность

пигментного эпителия и может способствовать отторжению трансплантата. Известно, что в регуляции иммунологического гомеостаза принимает участие большое количество факторов, среди которых ключевая роль отводится цитокинам, синтезируемым как интраокулярно, РПЭ, глиальными элементами сетчатки и пр., так и системно на уровне всего организма клеткам иммунной системы и других тканей [16].

Цель работы — изучение иммунологической реактивности при трансплантации ИПСК-РПЭ в условиях комбинированной иммуносупрессивной терапии в эксперименте у кроликов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При проведении эксперимента соблюдались международные принципы Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, изложенные в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС), «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных». Протокол настоящего исследования был утвержден Комитетом по этике НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России (выписка 53/1 из протокола заседания Комитета по этике № 53 от 08.04.2021).

Эксперимент выполнен на 27 кроликах-самцах породы новозеландские альбиносы (возраст 2,5–3,0 мес., вес 2,0–2,5 кг), из которых 24 животным (основные группы) проведена субретинальная трансплантация суспензии клеток человеческого РПЭ, полученных путем направленной дифференцировки ИПСК здорового донора и находящихся на хранении в биобанке в лаборатории клеточной биологии ФНКЦ ФХМ ФМБА России [17].

Предоперационная подготовка животных заключалась во внутримышечном введении обезболивающих препаратов: 0,3 мл Золетила® 50 и 0,55 мл 2 % Ксилазина; перед хирургическим вмешательством вводили 0,3 мл 0,4 % раствора Дексаметазона, 0,5 мл Этамзилата для снижения риска развития экссудативно-геморрагических интра- и послеоперационных осложнений.

Трансплантацию проводили в операционной под контролем ветеринара-анестезиолога. Введение ИПСК-РПЭ осуществляли в правый глаз доступом через pars plana с установкой портов 23 Ga с помощью ретинотомии на расстоянии 0,5 rd книзу от диска зрительного нерва в количестве 50 000 клеток, суспендированных в 0,05 мл фосфатно-солевого буферного раствора («ПанЭко», Россия). По завершении операции место введения ИПСК-РПЭ герметизировали с помощью 2–3 капель аутологичной плазмы, обогащенной тромбоцитами (PRP — Platelet-rich plasma) с целью предупреждения рефлюкса клеток в витреальную полость [18].

Животные-реципиенты были распределены на две группы: I группе (12 глаз) субретинальная трансплантация ИПСК-РПЭ была выполнена в здоровых глазах; во II группе (12 глаз) введение суспензии клеток проводили в область предварительно моделированной устойчивой атрофии РПЭ.

Группу контроля составили здоровые кролики (6 глаз) в возрасте 2,5–3 месяца, весом около 2,0 кг. После трансплантации животным опытных групп субконъюнктивально вводили гентамицин и дексаметазон в дозе 3 мг/кг веса и 0,2 мг/кг веса соответственно. Начиная с 1 суток после хирургического вмешательства в следующие 7 дней в конъюнктивальную полость 3 раза в день закапывали дексаметазон 0,1 %. Животные основных групп получали комбинированную иммуносупрессивную терапию. Интравитреально по завершении операции осуществляли введение 0,2–0,3 мл триамцинолона (40 мг/мл). Циклоспорин А вводили перорально в составе пищевой смеси в дозе 10 мг/кг 1 раз в сутки на протяжении всего срока наблюдения с первого дня после трансплантации в основных группах и до окончания эксперимента. Оценку результатов трансплантации выполняли с помощью стандартных и специализированных офтальмологических методов: биомикроскопии, оптической когерентной томографии (ОКТ), аутофлуоресценции (АФ) в режиме MultiColor, фоторегистрации глазного дна (Heidelberg Spectralis™ SD-OCT, Германия) на 14, 28, 60-е сутки после хирургического вмешательства. Известно, что макулярная область у кроликов отсутствует, а функцию фоточувствительной зоны сетчатки выполняет зрительная полоска (visual streak), в которой находится наибольшее количество фоторецепторов. Зрительная полоска располагается горизонтально по отношению к медуллярным волокнам и ниже ДЗН на 3 мм, ширина ее составляет 3–4 мм [19]. При проведении ОКТ толщину сетчатки измеряли в области зрительной полоски, за норму были приняты значения толщины сетчатки до проведения оперативного лечения, которые варьировали в диапазоне 140–160 мкм. В указанные сроки наблюдений производился забор крови (из ушной вены с помощью стерильных вакуумных систем), после которого животные были выведены из эксперимента методом воздушной эмболии, после введения в наркоз проводилась энуклеация (Приказ Минвуза СССР № 724 от 13.11.184).

Иммунологические исследования выполнены в 30 образцах стекловидного тела (СТ), выделенного в объеме не менее 1,5 мл из энуклеированных глаз, и 30 пробах сыворотки крови (СК) кроликов опытных и контрольной групп.

Пробоподготовка осуществлялась по стандартным методикам; биоматериал помещали в пробирки «Eppendorf» и хранили при температуре -70 °С до проведения исследований.

Концентрацию TGF-β1, TGF-β2, TSP-1, IL-2, IL-6 определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) тест-системами «Cloud-Clone Corp» (США), «Blue Gene» (КНР) согласно протоколу производителей. Учет результатов реакции вели на мультифункциональном микропланшетном фотометре Cytation 5 («BioTek», США) при длине волны 450 нм.

Статистическая обработка выполнена с использованием стандартных пакетов прикладных программ MSExcel, StatSoft12. При распределении параметров, отличном от нормального, применялись непараметрические методы анализа. Для определения статистически значимых различий (p) показателей двух независимых выборок использовали U -критерий Манна — Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали как $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследуемые цитокины обнаруживались в 100 % тест-проб животных-реципиентов ИПСК-РПЭ. В таблице 1 представлены медианы и диапазоны изменений их концентраций в СТ.

В контрольной группе локальный состав медиаторов отличался, а именно, в СТ здоровых животных отсутствовал TGF- β 1. Поскольку при обработке и сопоставлении результатов иммунологических исследований и морфометрии глазного дна в группах реципиентов не было обнаружено различий между показателями, определенными на сроках 28 и 60 суток после проведения трансплантации, в каждой из опытных групп, включая сравнение между ними, проведен анализ массивов данных за весь указанный период наблюдения, обозначенный в настоящей работе как ≥ 28 суток (табл. 1, 2).

Как следует из таблицы 1, на 14-е сутки после пересадки ИПСК-РПЭ в I группе (с интактным РПЭ) отмечалось значительное усиление локальной продукции TGF- β 1 по сравнению с таковым в контроле (43,9 пг/мл, диапазон колебаний от 0,0 до 438 пг/мл). В эти же сроки

у животных-реципиентов с дегенерацией сетчатки значение вышеуказанного показателя только в одном случае находилось за верхней границей диапазона нормальных значений, в целом сравнение медиан TGF- β 1 этой группы и контроля не показало статистически значимых отличий (табл. 1). Поздний послеоперационный период (28–60 суток) в I группе (с пересадкой ИПСК-РПЭ в здоровые глаза) характеризовался статистически значимым снижением уровня локальной продукции TGF- β 1, медиана которого составила 8,37 пг/мл и достоверно отличалась от таковой как в группе контроля, так и во II опытной группе (с атрофией РПЭ), в которой его значение практически не изменилось к 28–60-м суткам наблюдения (табл. 1).

В отличие от TGF- β 1, TGF- β 2 обнаруживался в СТ глаз контрольной группы. Медиана TGF- β 2 в контроле составила 1237 пг/мл, показатели локальной продукции цитокина не были подвержены широкому разбросу и варьировали в диапазоне от 813,8 до 1496 пг/мл (табл. 1).

В раннем послеоперационном периоде наблюдались сходные изменения продукции TGF- β 2 в обеих опытных группах. Так, на 14-е сутки после пересадки суспензии ИПСК-РПЭ как в глаза кроликов без патологии сетчатки, так и с моделью атрофии РПЭ уровень медиатора в СТ снизился и достиг одинаковых значений — 728,26 и 728,1 пг/мл (табл. 1).

В поздние сроки наблюдения в I и II группах отмечалось увеличение показателей интраокулярной продукции TGF- β 2, значения которых составили 1192 и 1582 пг/мл соответственно, при этом достоверное повышение продукции изучаемого цитокина

Таблица 1. Изменения концентраций иммунорегуляторных и супрессивных факторов TGF- β 1, β 2, TSP-1, цитокинов иммунного ответа IL-2, IL-6 в СТ животных-реципиентов после трансплантации ИПСК-РПЭ в эксперименте

Table 1. Changes in the immunoregulatory and suppressive factors TGF- β 1, β 2, TSP-1, immune response cytokines IL-2, IL-6 concentrations in the recipient animals vitreous humour after iPSCs-RPE transplantation in experiment

Показатель (единицы измерения) / Indicators (units of measurement)	Группы животных-реципиентов / Groups of recipient animals (Me; Q1–Q2)				Контроль / Control (n = 6)
	I		II		
	Интактный РПЭ / Intact RPE (n = 12)		Атрофия РПЭ / RPE atrophy (n = 12)		
	Период наблюдения (сутки) / Observation period (day)				
	14	≥28	14	≥28	
TGF-β1 (пг/мл) / (pg/ml)	43,9 (0,00–438,00)	8,37* (0,09–19,06)	0,09 (0,00–96,70)	0,08 (0,00–0,10)	0 (0,00–0,00)
TGF-β2 (пг/мл) / (pg/ml)	728,26 (538,7–889,0)	1192,0 (1161,0–1335,0)	728,1 (641,0–1353,0)	1582,0 (628,0–2357,0)	1237,4 (813,8–1496,0)
TSP-1 (нг/мл) / (ng/ml)	1,50 (0,78–1,91)	2,18 (1,07–3,86)	1,11 (0,97–3,0)	1,78 (0,88–31,0)	1,21 (1,08–2,08)
IL-2 (пг/мл) / (pg/ml)	12,5 (6,28–16,75)	23,07* (6,93–78,40)	6,93 (0,47–26,10)	0,0† (0,00–3,79)	1,2 (0,00–10,20)
IL-6 (пг/мл) / (pg/ml)	1,24 (1,14–3,52)	1,83* (1,49–2,00)	1,39 (1,29–2,06)	1,49 (0,99–1,75)	1,44 (1,29–1,74)

Примечание: n — количество глаз в группе; * достоверность отличия показателей при сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$); • достоверность отличия показателей при сравнении первой и второй групп на 28-е сутки после трансплантации ($p < 0,05$); † достоверность отличия в первой группе на 14-е и 28-е сутки ($p < 0,05$); ‡ достоверность отличия во второй группе на 14-е и 28-е сутки ($p < 0,05$).

Note: n — number of eyes in the group; * reliability of the difference of indicators in comparison with the control group ($p < 0.05$); • reliability of difference between the first and the second group on 28 days after transplantation ($p < 0.05$); † reliability of difference in the first group on 14 and 28 days ($p < 0.05$); ‡ reliability of difference in the second group on 14 and 28 days ($p < 0.05$).

определялось на 28–60-е сутки после трансплантации в глаза с неповрежденным РПЭ ($p < 0,05$) (табл. 1). Интраокулярная продукция тромбоспондина-1 (TSP-1) была выявлена как в опытных, так и контрольной группе — диапазон нормальных значений TSP-1 в СТ определялся в пределах 1,08–2,08 нг/мл, медиана составила 1,21 нг/мл. В целом после пересадки ИПСК-РПЭ в I и II группах отмечались незначительные изменения концентрации TSP-1 относительно нормы, однако эти сдвиги носили разнонаправленный характер в раннем посттрансплантационном периоде (табл. 1). Так, на 14-е сутки после субретинального введения ИПСК-РПЭ у животных I группы обнаружено некоторое повышение уровня TSP-1 в СТ по сравнению с таковым в контроле и, напротив, невыраженное ослабление в его интраокулярной продукции у моделей с дегенерацией сетчатки. На более поздних сроках после операции (28–60-е сутки) во всех опытных глазах определялось незначительное повышение концентрации TSP-1, более выраженное у животных в I группе (табл. 1). Анализ локальной динамики цитокинов иммунного ответа показал значительный подъем уровня IL-2 в СТ животных обеих опытных групп в раннем посттрансплантационном периоде и дальнейшее повышение его концентрации на поздних сроках наблюдения (до максимальной отметки 23,07 пг/мл) в I группе ($p < 0,05$) (табл. 1).

В группе моделей с атрофией РПЭ, напротив, поздний послеоперационный период характеризовался выраженным ослаблением продукции IL-2 (медиана составила 0,0 пг/мл) ($p < 0,05$) (табл. 1). Уровень интраокулярной продукции IL-6 как в I, так и во II опытной группе

через 14 суток после трансплантации не претерпевал значительных изменений относительно установленного диапазона нормы (минимум 1,29 и максимум 1,74 пг/мл), их медианы составили, соответственно, 1,24 и 1,39 пг/мл (табл. 1).

Однако в более позднем периоде наблюдения обнаруживалось достоверное повышение концентрации этого цитокина в СТ животных с трансплантацией ИПСК-РПЭ в здоровом глазу (I группа) ($p < 0,05$ при сравнении с таковым в этой группе на раннем сроке) (табл. 1).

Как следует из данных таблицы 2, на 14-е сутки наблюдения в СК I группы определялось статистически значимое снижение уровня TGF-β1 по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

В этот же срок концентрация указанного цитокина в крови реципиентов с дегенерацией сетчатки (II группа) в 2,5 раза достоверно превышала таковую в группе животных с проведенной им трансплантацией ИПСК-РПЭ в здоровый глаз ($p < 0,05$) (табл. 2). В позднем периоде наблюдалась обратная динамика TGF-β1, которая характеризовалась достоверным повышением его уровня в СК животных I группы и, напротив, значимым снижением показателя во II группе по сравнению с таковыми у реципиентов на 14-е сутки после пересадки ИПСК-РПЭ ($p < 0,05$) (табл. 2).

При анализе системной продукции TGF-β2 отмечены незначительные ее колебания относительно диапазона нормы, однако в ранний срок после трансплантации изменения концентрации данного цитокина в СК животных-реципиентов с атрофией РПЭ носили более заметный характер и выражались в достоверном подъеме его уровня по сравнению с показателем в I группе ($p < 0,05$)

Таблица 2. Изменения содержания иммунорегуляторных и супрессивных факторов TGF-β1, β2, TSP-1, цитокинов иммунного ответа IL-2, IL-6 в СК животных-реципиентов после трансплантации ИПСК-РПЭ в эксперименте

Table 2. Changes in the immunoregulatory and suppressive factors TGF-β1, β2, TSP-1, immune response cytokines IL-2, IL-6 content in the recipient animals blood serum after transplantation of iPSCs-RPE in experiment

Показатель (единицы измерения) / Indicators (units of measurement)	Группы животных-реципиентов / Groups of recipient animals (Me; Q1–Q2)				Контроль / Control (n = 6)
	I Интактный РПЭ / Intact RPE (n = 12)		II Атрофия РПЭ / RPE atrophy (n = 12)		
	Период наблюдения (сутки) / Observation period (day)				
	14	≥28	14	≥28	
TGF-β1 (нг/мл) / (pg/ml)	282,0* (0,0–351,0)	430,0# (423,0–479,0)	730,0• (478,0–767,0)	290,0‡ (0,98 — 598,4)	469,0 (402,0–584,0)
TGF-β2 (нг/мл) / (pg/ml)	1148,0 (325,0–1321,0)	1116,0 (999,0–1441,0)	1378,0• (1363,0–1506,0)	1214,0‡ (671,0–2111,0)	1041,0 (427,0–1143,0)
TSP-1 (нг/мл) / (ng/ml)	10,1* (8,4–16,35)	10,3* (4,07–17,7)	8,29 (6,59–11,9)	8,21 (5,18–30,90)	5,17 (3,55–6,77)
IL-2 (нг/мл) / (pg/ml)	0,0* (0,0–14,1)	0,0 (0,0–14,1)	0,0 (0,0–18,7)	0,0 (0,00–24,7)	10,5 (4,98–16,09)
IL-6 (нг/мл) / (pg/ml)	1,39 (1,39–1,59)	1,31 (1,14–1,49)	1,5 (1,14–1,49)	1,24‡ (0,99–1,39)	0,99 (0,93–1,95)

Примечание: n — количество глаз в группе; * достоверность отличия показателей при сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$); • достоверность отличия показателей при сравнении первой и второй групп на 14 сутки после трансплантации ($p < 0,05$); # достоверность отличия в первой группе на 14-е и 28-е сутки ($p < 0,05$); ‡ достоверность отличия во второй группе на 14-е и 28-е сутки ($p < 0,05$).

Note: n — number of eyes in the group; * reliability of the difference of indicators in comparison with the control group ($p < 0,05$); • reliability of difference between the first and the second group on 14 days after transplantation ($p < 0,05$); # reliability of difference in the first group on 14 and 28 days ($p < 0,05$); ‡ reliability of difference in the second group on 14 and 28 days ($p < 0,05$).

(табл. 2). На 14-е сутки после субретиального введения ИПСК-РПЭ в СК всех животных выявлено значительное увеличение концентрации TSP-1 (достоверные различия получены при сравнении I группы и контроля) (табл. 2). На более поздних сроках после операции содержание TSP-1 в СК реципиентов оставалось практически без изменений (табл. 2). IL-2 в крови большинства животных опытных групп не обнаруживался: медиана составила 0 пкг/мл, и только в единичных случаях у реципиентов

с дегенерацией сетчатки значение показателя находилось за верхней границей установленного диапазона нормальных значений (табл. 2).

Показатели сывороточного IL-6 в исследуемых группах на всех сроках наблюдения не претерпевали резких изменений. В указанные сроки наблюдения проводили офтальмологические исследования. Снимки ОКТ, данные измерений толщины сетчатки животных двух опытных групп представлены на рисунках 1, 2 и в таблице 3.

По данным биомикроскопии на 14, 28–60-е сутки после трансплантации суспензии ИПСК-РПЭ передний отрезок глаза всех животных-реципиентов был спокоен: конъюнктивa имела бледно-розовый цвет, роговица, хрусталик и стекловидное тело сохраняли прозрачность.

При офтальмоскопии в эти же сроки наблюдения не визуализировались патологические изменения на глазном дне (отсутствовали воспалительные явления в переднем и заднем отрезках глаза, не отмечено случаев отслойки сетчатки, образования шварт, кровоизлияний, экссудатов, побледнений сетчатки, патологических очагов). Не было выявлено отличий между показателями толщины сетчатки в контроле и у животных I группы (с интактным РПЭ до проведения трансплантации). Полученные данные соответствовали значениям нормы, установленной в работах F.A. Davis (1929) и в позднем исследовании Z. Xiao-Xu и соавт. в 2012 г. [19, 20].

При проведении ОКТ у кроликов с интактным РПЭ (I группа) на 14-е сутки профиль сетчатки не был изменен, все ее слои дифференцировались, под нейросенсорной сетчаткой визуализировалась зона умеренной гиперрефлексивности, соответствующая локализации трансплантированных клеток (рис.1б, белая стрелка).

К 28-м суткам наблюдения и далее к 60-м суткам отмечалась более ровная гиперрефлексивность монослоя под нейросенсорной сетчаткой, позволяющая говорить о распределении субретиально введенного клеточного материала (желтая стрелка). В эти же сроки, по данным ОКТ, профиль и структура сетчатки оставались неизмененными (рис. 1в).

Во II опытной группе до трансплантации, по данным ОКТ, обнаруживалась область повышенного проникновения сканирующего луча в подлежащие ткани, свидетельствующая о формировании атрофии РПЭ (рис. 2а).

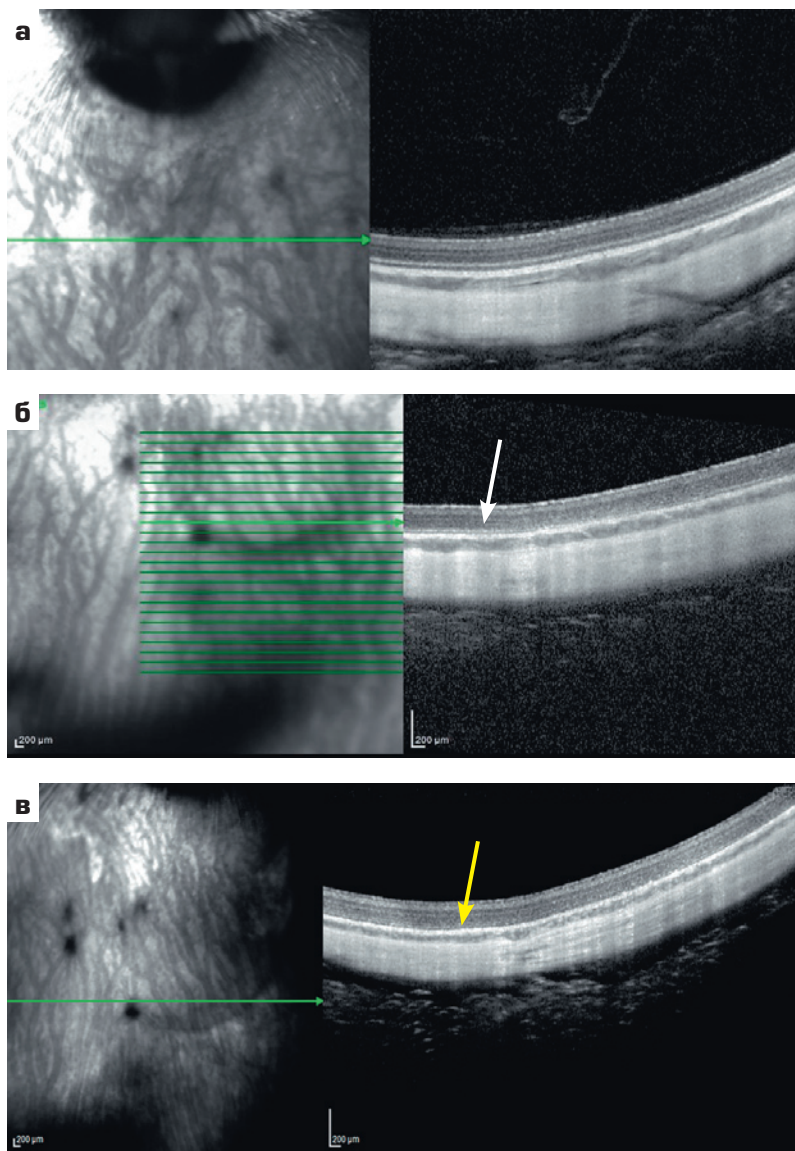


Рис. 1. ОКТ-снимки, выполненные в разные сроки наблюдения при субретиальной трансплантации ИПСК-РПЭ животным в здоровый глаз (I группа), горизонтальный срез: а — до операции; б — на 14-е сутки (белая стрелка — зона гиперрефлексивности, соответствующая месту введения суспензии клеток); в — на 28-е сутки и более. Объяснение в тексте статьи

Fig. 1. OCT-images performed at different follow-up periods during subretinal transplantation of iPSCs-RPE into healthy eye (group I), horizontal slice: a — preoperatively; б — on the 14th day (white arrow — hyperreflectivity zone corresponding to the place of cell suspension injection); в — on 28 days and more. Explanation in the article text

На 14-е сутки после субретинального введения суспензии ИПСК-РПЭ профиль сетчатки сохранен, слои сетчатки дифференцированы, на срезах не выявлено ОКТ-признаков воспалительных и других патологических изменений сетчатки (рис. 2б).

В позднем периоде наблюдения (28–60-е сутки) отмечается частичное уменьшение прохождения сканирующего луча под сетчатку, что может указывать на частичное восстановление клеток РПЭ. Осложнений и отрицательной динамики не было выявлено, слои сетчатки были дифференцированы (рис. 2в). В ходе анализа данных морфометрии сетчатки, полученных при проведении ОКТ, в группе животных-реципиентов с атрофией РПЭ на 14-е сутки после трансплантации выявлено статистически значимое увеличение показателя толщины сетчатки: медиана составила 101,5 мкм ($p < 0,05$) и оставалась стабильной до окончания периода наблюдения (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Особенности глаза как иммунопривилегированного органа, по мнению ряда авторов, создают относительно безопасные условия для трансплантации ПСК-РПЭ — наиболее перспективного подхода для лечения тяжелых дегенеративных заболеваний сетчатки, однако введение ксеногенных СК вызывает тяжелое воспаление в заднем отрезке глаза, деструкцию и гибель донорского материала у экспериментальных животных [13, 25]. При испытании биомедицинских клеточных продуктов используют линии иммуномодифицированных/гуманизированных животных [14], как правило, мелких грызунов, чьи особенности глаз не позволяют полноценно осуществлять офтальмохирургические вмешательства, выполняемые у человека, а модели с большим глазным яблоком и генетически обусловленным иммунодефицитом

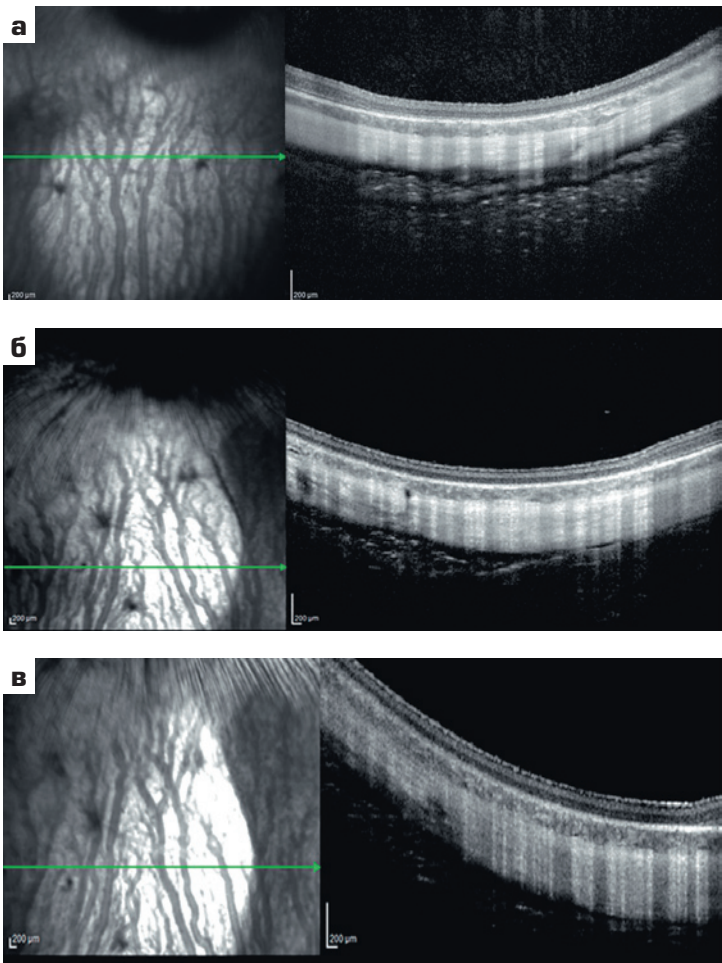


Рис. 2. ОКТ-снимки, выполненные в сроки до и в разные сроки наблюдения при проведении субретинальной трансплантации ИПСК-РПЭ животным в глаз атрофией РПЭ (II группа), горизонтальный срез: а — до операции; б — на 14-е сутки; в — на 28-е сутки и более. Объяснение в тексте статьи

Fig. 2. OCT images performed at pre- and at different follow-up times during subretinal transplantation of iPSCs-RPE animals into the eye with RPE atrophy (group II), horizontal slice: а — preoperatively; б — on the 14th day; в — on 28 days and more. Explanation in the article text

Таблица 3. Показатели толщины сетчатки (мкм) в опытных группах и контроле группах в разные сроки наблюдения

Table 3. Retinal thickness indicators (μm) in experimental and control groups at different follow-up periods

Сроки наблюдения (сутки) / Observation period (day)	Толщина сетчатки (мкм) в группах / Retinal thickness(μm) in groups (Me; Q1–Q2)		
	I Интактный РПЭ / Intact RPE (n = 12)	II Атрофия РПЭ / RPE atrophy (n = 12)	Контроль / Control (n = 6)
0 (до трансплантации) / (before transplantation)	150 (100–160)	95* (85–110)	150 (140–160) (на всем сроке наблюдения) / (throughout the entire observation period)
14	135 (100–177)	101,5*† (80–115)	
28	135 (100–160)	100 (80–113)	
60	128 (104–150)	100 (80–110)	

Примечание: n — количество глаз в группе; * достоверность отличия показателей при сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$); † достоверность отличия во второй группе на 14-е сутки по сравнению с исходом ($p < 0,05$).
Note: n — number of eyes in the group; * reliability of the difference between the parameters when compared to the control group ($p < 0.05$); † reliability of difference in the second group on the 14th day compared to the outcome ($p < 0.05$).

отсутствуют. В данной ситуации использование иммуносупрессивной терапии у более крупных животных, например кроликов, традиционно используемых в экспериментальной офтальмологии, представляется альтернативным решением, поскольку только при достижении иммунологической толерантности трансплантированные клетки могут проявлять свое биологическое действие в полном объеме. При разработке и внедрении метода заместительной трансплантации ИПСК-РПЭ в клинику важно учитывать, что нарушение иммунной привилегии глаза вследствие снижения барьерной функции пигментного эпителия, что связано с хирургическим вмешательством, патологическим процессом в сетчатке (например, при ВМД), ведет к изменению иммунологической реактивности организма и может способствовать отторжению трансплантата [14].

В регуляции иммунного гомеостаза органа зрения участвует много факторов, среди которых ключевая роль отводится цитокинам, синтезируемым как интраокулярно, так и системно, однако работы, посвященные изучению их динамики при трансплантации ИПСК-РПЭ, не представлены в литературе. Было предпринято исследование локальной (в глазу) и системной (в крови) продукции медиаторов иммунного ответа IL-2, IL-6, иммунорегуляторных и супрессивных факторов TGF- β 1, TGF- β 2, TSP-1 в ранние и поздние сроки после трансплантации ИПСК-РПЭ в СРП здорового глаза (I группа) и с предварительно сформированной (за 1 мес. до операции) устойчивой атрофией РПЭ (II группа) кроликов, получавших комбинированную иммуносупрессивную терапию. Известно, что основной путь реализации острого повреждения ксенотрансплантата — это активация системы комплемента с выделением цитокинов острого ответа [21].

В настоящей работе для мониторинга воспалительной реакции и ранних признаков отторжения в СТ и СК определяли IL-6 согласно рекомендации V. Enzmann и соавт. [35].

Интраокулярный синтез данного цитокина, по данным T. Zhou и соавт., осуществляется клетками глии и РПЭ и значительно усиливается при их патологической активации, связанной со старением, дегенеративными изменениями сетчатки [22]. В нашем исследовании на ранних и поздних сроках после трансплантации в обеих опытных группах не было отмечено существенного подъема его локальной продукции (табл. 1). Скорее всего, это явилось результатом действия интравитреально введенного во время хирургического вмешательства кеналого — препарата с противовоспалительной активностью. Не обнаружено также существенных колебаний IL-6 и в СК у животных I и II групп относительно нормы (табл. 2).

Еще одним механизмом повреждения ксенотрансплантата является клеточная реакция отторжения, опосредуемая IL-2 и сходная с таковой при аллогенной трансплантации [23]. Известно, что при ксенотрансплантации,

как и в случае аллогенной пересадки, существует не прямое распознавание трансплантата, опосредованное через фагоцитоз. Однако в силу большого количества пептидных различий между разными видами потенциал косвенного распознавания ксенотрансплантата гораздо выше, чем косвенного аллораспознавания [24].

На протяжении всего срока наблюдения после трансплантации ИПСК-РПЭ в подавляющем большинстве случаев нами не было выявлено системной продукции IL-2, медиана показателя в СК опытных групп находилась на отметке 0,0 пг/мл, и только в единичных пробах СК этот цитокин определялся в концентрациях, незначительно превышающих норму (табл. 2). Таким образом, данные результаты свидетельствовали о прямом системном действии Циклоспорина А. Интересно отметить, что в нашем исследовании IL-2 был обнаружен практически во всех пробах СТ и СК животных контрольной группы (табл. 1, 2). Парадоксальное, на первый взгляд, присутствие IL-2 в среде СТ здоровых глаз, не содержащей иммунокомпетентные клетки, согласуется с данными работ S. Girard и соавт. (2008); M.S. Serrano-Pérez и соавт. (2011), в которых представлены убедительные доказательства синтеза этого цитокина клетками астроглии, экспрессирующими NFAT без участия Т-лимфоцитов [36, 37].

Значимое усиление интраокулярной продукции IL-2, наблюдаемое через 14 дней после пересадки ИПСК-РПЭ у животных обеих опытных групп (табл. 1), позволяет думать об активации локальной защитной реакции, направленной на предотвращение повреждения сетчатки. Действительно, подобный ответ с продукцией этого цитокина клетками микроглии при ишемии и травме нервной ткани описан в исследовании S. Girard и соавт. [36]. Повышенное содержание IL-2 в СТ животных I группы в более поздний период (28–60-е сутки) не позволяет исключить субклиническую реакцию на введенные клетки в сетчатку, что нуждается в дальнейшем исследовании.

В эти же сроки наблюдения в СТ кроликов с атрофией РПЭ указанный цитокин не определялся, отсутствие его интраокулярного синтеза, скорее всего, могло быть вызвано изменениями в сетчатке, моделированными до трансплантации, и прямым действием Циклоспорина А, способного проникать через поврежденный ГРБ и блокировать продукцию IL-2 в клетках микроглии.

GF- β 1, известный своим противовоспалительным и иммуносупрессивным эффектом, является ключевым регулятором системного иммунного ответа. Так, нулевая мутация в гене, кодирующем молекулу цитокина, приводит к развитию тяжелого воспалительного процесса у мышей, мультиорганной инфильтрации лейкоцитами, продукции аутоантител и ранней гибели животного [26]. Участие TGF- β 1 в контроле опосредованной Т-клетками толерантности путем активной супрессии Th1- и Th2-лимфоцитов и, напротив, активации регуляторных Т-клеток на периферии, его значительная роль

в индукции и поддержании иммунной толерантности трансплантированных органов, обладающих иммунной привилегией (в частности, печени), представляет также особый интерес и в офтальмологии, в которой, в отличие от хорошо изученной изоформы TGF- β 2, важного иммуносупрессивного фактора внутренних сред глаза, свойства TGF- β 1 остаются неизвестными.

В тест-пробах СТ животных контрольной группы не было обнаружено TGF- β 1, что свидетельствовало об отсутствии его синтеза в здоровом глазу (табл. 1). Принимая во внимание обстоятельство, что большинство факторов иммуносупрессии — компонентов среды СТ — секретируются пигментным эпителием, полученные нами результаты согласуются с данными L. Hirsch и соавт., которые показали, что основной изоформой, конститутивно продуцируемой культурой клеток РПЭ в условиях нормы, является TGF- β 2, но не TGF- β 1 [27]. В раннем и отдаленном периоде наблюдения после трансплантации был выявлен разнонаправленный характер локальной и системной динамики TGF- β 1 в основных группах (табл. 1, 2). Резкий подъем локального уровня TGF- β 1 на 14-е сутки после введения ИПСК-РПЭ в здоровый глаз (табл. 1) и последующее снижение цитокина в более поздние сроки (к 28–60-м суткам) (табл. 2) позволяет думать об активации адаптационных механизмов, направленных на ограничение воспаления и репарацию, поддерживаемых в сетчатке глиальными элементами и нейронами.

Нами не найдена информация, прямо свидетельствующая о способностях сетчатки к индуцированному синтезу TGF- β 1, однако в работах, посвященных исследованиям репаративных механизмов в нервной системе, представлены доказательства повышения его экспрессии в астроцитах и микроглии при широком спектре нейрональных повреждений: старении, в моделях церебральной ишемии *in vivo* и пр. [28–30]. В СТ животных-моделей с атрофией РПЭ в течение всего периода наблюдения TGF- β 1 после введения ИПСК-РПЭ либо не выявлялся, либо обнаруживался в минимальных концентрациях (табл. 1), что скорее всего, было связано с индуцированным за 30 дней до трансплантации повреждением пигментного эпителия, дегенеративными изменениями в сетчатке, ведущими к несостоятельности гематоретинального барьера.

Изменению локальной продукции TGF- β 1 мог напрямую способствовать ЦсА, свободно проникающий через поврежденный гематоретинальный барьер и ингибирующий его локальный синтез [31]. Особый интерес представляют результаты анализа системной динамики TGF- β 1, что позволило выявить разнохарактерные изменения его концентраций в СК животных опытных групп в ранние и отдаленные сроки после трансплантации ИПСК-РПЭ. Снижение уровня цитокина в СК реципиентов ИПСК-РПЭ без офтальмопатологии через 14 суток после трансплантации объясняется непосредственным потреблением этого цитокина *in situ*, требуемого

для индукции и поддержания иммунологической толерантности.

В отдаленные сроки наблюдения содержание TGF- β 1 в СК в этой группе повысилось и практически достигло значений нормы (табл. 2). Наши результаты согласуются с данными исследования О.П. Шевченко и соавт., которые описали аналогичную динамику этого цитокина в крови детей-реципиентов при пересадке печени [32]. Эти же авторы выявили взаимосвязь благоприятного исхода трансплантации с повышением (нормализацией) системного уровня TGF- β 1, определили диагностическую значимость цитокина в качестве биомаркера дисфункции трансплантата и потребность в индивидуальном дозировании иммуносупрессивной терапии.

Транслируя заключения авторов применительно к нашей работе и учитывая описанные выше клинические результаты, можно, хотя и с некоторой осторожностью, заключить о правильно подобранной дозе Циклоспорина А в группе животных реципиентов ИПСК-РПЭ без поражения глаза. Противоположная динамика сывороточного TGF- β 1 во II опытной группе (табл. 2), обнаруженная на ранних и отдаленных сроках после трансплантации, может быть обусловлена, по нашему мнению, нарушением иммунной привилегии глаза вследствие повреждения гематоретинального барьера при ранее моделированной атрофии РПЭ до трансплантации. Как известно, цитокины семейства TGF- β , синтезируемые локально и системно, находятся в латентном состоянии, для реализации их биологических эффектов требуется перевод в активную форму.

В интраокулярных средах и крови изоформы TGF- β активируются в присутствии тромбоспондина-1 (TSP-1) — белка, обладающего протеазной активностью, и таким образом вносят свой вклад в поддержание толерантности [33, 34]. На протяжении всего периода наблюдения после пересадки ИПСК-РПЭ в обеих опытных группах не было отмечено значительных изменений интраокулярных концентраций этого белка относительно нормы, а в СК обнаружен закономерный рост уровня TSP-1 (защитная реакция), который свидетельствовал о том, что системно применяемый Циклоспорин А не влиял на его синтез. Во время динамического контроля за животными в период наблюдения после оперативного вмешательства в опытных группах не было выявлено клинических и ОКТ-признаков воспаления и других патологических изменений в сетчатке.

Выводы

1. Анализ результатов офтальмологических методов исследований, динамики цитокинов иммунного ответа IL-2, IL-6, факторов иммунологической толерантности TGF- β 1 и TSP-1 доказывает способность комбинированной иммуносупрессивной терапии, включающей однократное интраоперационное интравитреальное введение кеналага + системное введение циклоспорина А,

предотвращать реакцию отторжения ксеногенного клеточного материала при субретинальной трансплантации как в здоровый глаз, так и при предварительно сформированной атрофии пигментного эпителия сетчатки.

2. Применение комбинированной иммуносупрессивной терапии у более крупных моделей — кроликов позволило получить доказательства безопасности метода субретинальной трансплантации клеток ретинального пигментного эпителия, дифференцированного из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека.

УЧАСТИЕ АВТОРОВ:

Нероева Н.В. — концепция и дизайн обзора, написание и финальное редактирование статьи;
Балацкая Н.В. — концепция и дизайн обзора, анализ литературы, интерпретация результатов, написание и редактирование статьи;
Бриллиантова А.Г. — сбор данных, статистический анализ, подготовка иллюстраций, написание статьи;
Катаргина Л.А. — концепция и дизайн обзора, написание и редактирование статьи;
Харитонов А.Е. — проведение исследования, техническое сопровождение эксперимента, обработка данных;
Лагарькова М.А. — дизайн исследования, техническое сопровождение эксперимента;
Богомазова А.Н. — проведение исследования, техническое сопровождение эксперимента, обработка данных.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Wong WL, Su X, Li X, Cheung CM, Klein R, Cheng CY, Wong TY. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2014 Feb;2(2):e106–116. doi: 10.1016/S2214-109X(13)70145-1.
- Jin ZB, Gao ML, Deng WL, Wu KC, Sugita S, Mandai M, Takahashi M. Stemming retinal regeneration with pluripotent stem cells. *Prog Retin Eye Res*. 2019 Mar;69:38–56. doi: 10.1016/j.preteyeres.2018.11.003.
- Klein R, Klein BE, Cruickshanks KJ. The prevalence of age-related maculopathy by geographic region and ethnicity. *Prog Retin Eye Res*. 1999 May;18(3):371–389. doi: 10.1016/S1350-9462(98)00025-1.
- Nita M, Strzalka-Mrozik B, Grzybowski A, Romaniuk W, Mazurek U. Ophthalmic transplantology: posterior segment of the eye-part II. *Med Sci Monit*. 2012 Jun;18(6):RA97–103. doi: 10.12659/msm.882868.
- Petrash CC, Palestine AG, Canto-Soler MV. Immunologic Rejection of Transplanted Retinal Pigmented Epithelium: Mechanisms and Strategies for Prevention. *Front Immunol*. 2021 May 12;12:621007. doi: 10.3389/fimmu.2021.621007.
- Харитонов А.Е., Сурдина А.В., Лебедева О.С., Богомазова А.Н., Лагарькова М.А. Возможности использования плюрипотентных стволовых клеток для восстановления поврежденного пигментного эпителия сетчатки глаза. *Acta Naturae*. 2018;10(3):31–41. Kharitonov AE, Surдина AV, Lebedeva OS, Bogomazova AN, Lagarkova MA. Possibilities for using pluripotent stem cells for restoring damaged eye retinal pigment epithelium. *Acta Naturae*. 2018;10(3):31–41 (In Russ.). doi: 10.32607/20758251-2018-10-3-30-39.
- Li L, Baroja ML, Majumdar A, Chadwick K, Rouleau A, Gallacher L, Ferber I, Lebkowski J, Martin T, Madrenas J, Bhatia M. Human embryonic stem cells possess immune-privileged properties. *Stem Cells*. 2004;22(4):448–456. doi: 10.1634/stemcells.22-4-448.
- Drukker M, Katchman H, Katz G, Even-Tov Friedman S, Shezen E, Hornstein E, Mandelboim O, Reisner Y, Benvenisty N. Human embryonic stem cells and their differentiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells. *Stem Cells*. 2006 Feb;24(2):221–229. doi: 10.1634/stemcells.2005-0188. Epub 2005 Aug 18.
- Zhou R, Caspi RR. Ocular immune privilege. *F1000 Biol Rep*. 2010 Jan 18;2:3. doi: 10.3410/B2-3.
- Sugita S, Futatsugi Y, Ishida M, Edo A, Takahashi M. Retinal Pigment Epithelial Cells Derived from Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells Suppress or Activate T Cells via Costimulatory Signals. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 5;21(18):6507. doi: 10.3390/ijms21186507.
- Jiang LQ, Jorquera M, Streilein JW. Subretinal space and vitreous cavity as immunologically privileged sites for retinal allografts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993 Nov;34(12):3347–3354.
- Rajendran Nair DS, Zhu D, Sharma R, Martinez Camarillo JC, Bharti K, Hinton DR, Humayun MS, Thomas BB. Long-Term Transplant Effects of iPSC-RPE Monolayer in Immunodeficient RCS Rats. *Cells*. 2021 Oct 29;10(11):2951. doi: 10.3390/cells10112951.
- Rezaei KA, Farrokhi-Siar L, Godowski K, Patel SC, Ernest JT. A model for xenogenic immune response. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2000 Apr;238(4):352–358. doi: 10.1007/s004170050364.
- Тихомирова АВ, Горячев ДВ, Меркулов ВА, Лысикова ИВ, Губенко АИ, Зеврев АИ, Соловьева АП, Ромодановский ДП, Мельникова ЕВ. Доклинические и клинические аспекты разработки биомедицинских клеточных продуктов. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2018;8(1): 23–35. Tikhomirova AV, Goryachev DV, Merkulov VA, Lysikova IV, Gubenko AI, Zebrev AI, Solovieva AP, Romodanovskiy DP, Melnikova EV. Preclinical and Clinical Aspects of the Development of Biomedical Cell Products. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation* 2018;8(1):23–35 (In Russ.). doi: 10.30895/1991-2919-2018-8-1-23-35.
- Koster C, Wever KE, Wagstaff EL, Van den Hurk KT, Hooijmans CR, Bergen AA. A Systematic Review on Transplantation Studies of the Retinal Pigment Epithelium in Animal Models. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr;21(8):2719. doi: 10.3390/ijms21082719.
- Newell KA, Turka LA. Tolerance signatures in transplant recipients. *Curr Opin Organ Transplant*. 2015 Aug;20(4):400–405. doi: 10.1097/MOT.0000000000000207.
- Нероева НВ, Нероев ВВ, Катаргина ЛА, Рябина МВ, Илюхин ПА, Кармокова АГ, Лосанова ОА, Майбогин АМ, Харитонов АЕ, Еремеев АВ, Лагарькова МА. Заместительная трансплантация стволовыми клетками при атрофии ретинального пигментного эпителия в эксперименте. *Вестник офтальмологии*. 2022;138(3):7–15. Neroeva NV, NEROEV VV, Katargina LA, Ryabina MV, Ilyukhin PA, Karmokova AG, Losanova OA, Maybogin AM, Kharitonov AE, Ereemeev AV, Lagarkova MA. Experimental stem cell replacement transplantation in retinal pigment epithelium atrophy. *Vestnik Oftalmologii*. 2022;138(3):7–15 (In Russ.). doi: 10.17116/oftalma20221380317.
- Нероева НВ, Нероев ВВ, Катаргина ЛА, Рябина МВ, Илюхин ПА, Кармокова АГ, Лосанова ОА, Майбогин АМ, Лагарькова МА, Еремеев АВ, Харитонов АЕ. Способ субретинальной трансплантации клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ), дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, при атрофии ретинального пигментного эпителия в эксперименте. Патент RU 2729937, 15.11.2019. Neroeva NV, NEROEV VV, Katargina LA, Ryabina MV, Ilyukhin PA, Karmokova AG, Losanova OA, Maybogin AM, Lagarkova MA, Ereemeev AV, Kharitonov AE. Method of transplantation of retinal pigment epithelium (rpe) cells differentiated from induced human pluripotent stem cells, with retinal pigment epithelium atrophy. PatentRU 2729937, 15.11.2019 (In Russ.).
- Davis FA. The Anatomy and Histology of the Eye and Orbit of the Rabbit. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1929;27:400–441.
- Zhou XX, Song YP, Zhao YX, Wu JG. Induction of Branch Retinal Vein Occlusion by Photodynamic Therapy with Rose Bengal in a Rabbit Model [Internet]. *Advances in Ophthalmology*. InTech; 2012. doi: 10.5772/27623.
- Гуляев ВА, Хубутия МШ, Новрузбеков МС, Миронов АС. Ксенотрансплантация: история, проблемы и перспективы развития. *Трансплантология* 2019; 11(1):37–54. doi: 10.23873/2074-0506-2019-11-1-37-54. Gulyaev VA, Khubutiya MSH, Novruzbekov MS, Mironov AS. Xenotransplantation: history, problems and development prospects. *The Russian Journal of Transplantation*. 2019;11(1):37–54 (In Russ.). doi: 10.23873/2074-0506-2019-11-1-37-54.
- Zhou T, Huang Z, Sun X, Zhu X, Zhou L, Li M, Cheng B, Liu X, He C. Microglia Polarization with M1/M2 Phenotype Changes in rd1 Mouse Model of Retinal Degeneration. *Front Neuroanat*. 2017 Sep 5;11:77. doi: 10.3389/fnana.2017.00077. eCollection 2017.
- Chan JL, Singh AK, Corcoran PC, Thomas ML, Lewis BG, Ayares DL, Vaught T, Horvath KA, Mohiuddin MM. Encouraging experience using multi-transgenic xenografts in a pig to baboon cardiac xenotransplantation mode. *Xenotransplantation*. 2017;24(6): e12330. doi: 10.1111/xen.12330.
- Cooper DKC, Pierson RN 3rd, Hering BJ, Mohiuddin MM, Fishman JA, Denner J, Ahn C, Azimzadeh AM, Buhler LH, Cowan PJ, Hawthorne WJ, Kobayashi T, Sachs DH. Regulation of clinical xenotransplantation — time for a reappraisal. *Transplantation*. 2017;101(8):1766–1769. doi: 10.1097/TP.000000000000168332.
- Ilmarinen T, Hiidenmaa H, Kööbi P, Nymark S, Sorkio A, Wang JH, Stanzel BV, Thielges F, Alajuuja P, Oksala O, Katja M, Uusitalo H, Skottman H. Ultrathin Polyimide Membrane as Cell Carrier for Subretinal Transplantation of Human Embryonic Stem Cell Derived Retinal Pigment Epithelium. *PLoS One*. 2015 Nov 25;10(11):e0143669. doi: 10.1371/journal.pone.0143669.
- Li MO, Wan YY, Flavell RA. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity*. 2007 May;26(5):579–591. doi: 10.1016/j.immuni.2007.03.014.
- Hirsch L, Nazari H, Sreekumar PG, Kannan R, Dustin L, Zhu D, Barron E, Hinton DR. TGF-β2 secretion from RPE decreases with polarization and becomes apically oriented. *Cytokine*. 2015 Feb;71(2):394–6. doi: 10.1016/j.cyto.2014.11.014.
- Hamby ME, Hewett JA, Hewett SJ. Smad3-dependent signaling underlies the TGF-β1-mediated enhancement in astrocytic iNOS expression. *Glia*. 2010 Aug 15;58(11):1282–1291. doi: 10.1002/glia.21005.
- Flanders KC, Ren RF, Lipka CE. Transforming growth factor-betas in neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol*. 1998 Jan;54(1):71–85. doi: 10.1016/S0301-0082(97)00066-x.

30. Henrich-Noack P, Prehn JH, Kriegelstein J. TGF-beta 1 protects hippocampal neurons against degeneration caused by transient global ischemia. Dose-response relationship and potential neuroprotective mechanisms. *Stroke*. 1996 Sep;27(9):1609–1614; discussion 1615. doi: 10.1161/01.st.27.9.1609.
31. Zhang JG, Walmsley MW, Moy JV, Cunningham AC, Talbot D, Dark JH, Kirby JA. Differential effects of cyclosporin A and tacrolimus on the production of TGF-beta: implications for the development of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Transpl Int*. 1998;11 Suppl 1:S325–327. doi: 10.1007/s001470050489.
32. Шевченко ОП, Цирульников ОМ, Курабекова РМ, Цирульникова ИЕ, Олещенко ГА, Готье СВ. Уровень трансформирующего фактора роста $\beta 1$ в плазме крови детей-реципиентов печени и его связь с функцией трансплантата. *Иммунология*. 2015;36(6):343–347. Shevchenko OP, Cirul'nikova OM, Kurabekova RM, Cirul'nikova IE, Olefirenko GA, Got'e SV. Blood plasma level of transforming growth factor $\beta 1$ in pediatric liver transplant recipients and its relationship with graft function. *Immunology*. 2015;36(6):343–347.
33. Masli S, Turpie B, Hecker KH, Streilein JW. Expression of thrombospondin in TGF-beta-treated APCs and its relevance to their immune deviation-promoting properties. *J Immunol*. 2002 Mar 1;168(5):2264–2273. doi: 10.4049/jimmunol.168.5.2264.
34. Masli S, Turpie B, Streilein JW. Thrombospondin orchestrates the tolerance-promoting properties of TGFbeta-treated antigen-presenting cells. *Int Immunol*. 2006 May;18(5):689–699. doi: 10.1093/intimm/dxl006.
35. Enzmann V, Faude F, Wiedemann P, Kohlen L. The local and systemic secretion of the pro-inflammatory cytokine interleukin-6 after transplantation of retinal pigment epithelium cells in a rabbit model. *Curr Eye Res*. 2000 Jul;21(1):530–534.
36. Girard S, Larouche A, Kadhim H, Rola-Pleszczynski M, Gobeil F, Sébire G. Lipopolysaccharide and hypoxia/ischemia induced IL-2 expression by microglia in neonatal brain. *Neuroreport*. 2008 Jul 2;19(10):997–1002. doi: 10.1097/WNR.0b013e3283036e88.
37. Serrano-Pérez MC, Martín ED, Vaquero CF, Azcoitia I, Calvo S, Cano E, Tranque P. Response of transcription factor NFATc3 to excitotoxic and traumatic brain insults: identification of a subpopulation of reactive astrocytes. *Glia*. 2011 Jan;59(1):94–107. doi: 10.1002/glia.21079.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Нероева Наталья Владимировна
кандидат медицинских наук, врач отделения патологии сетчатки и зрительного нерва
ул. Садовая-Черногызская, 14/19, Москва, 105062, Российская Федерация
<https://orcid.org/0000-0003-1038-2746>

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Балацкая Наталья Владимировна
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, начальник отдела иммунологии и вирусологии
ул. Садовая-Черногызская, 14/19, Москва, 105062, Российская Федерация
<https://orcid.org/0000-0001-8007-6643>

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Бриллиантова Ангелина Грантовна
аспирант отдела патологии сетчатки и зрительного нерва;
ул. Садовая-Черногызская, 14/19, Москва, 105062, Российская Федерация
<https://orcid.org/0000-0001-6424-8724>

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Катаргина Людмила Анатольевна
доктор медицинских наук, профессор, начальник отдела патологии глаз у детей, заместитель директора по научной работе
ул. Садовая-Черногызская, 14/19, Москва, 105062, Российская Федерация
<https://orcid.org/0000-0002-4857-0374>

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина» Федерального медико-биологического агентства
Харитонов Анатолий Евгеньевич
младший научный сотрудник лаборатории клеточной биологии
ул. Малая Пироговская, 1а, Москва, 119435, Российская Федерация
<https://orcid.org/0000-0003-1420-1164>

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина» Федерального медико-биологического агентства
Лагарькова Мария Андреевна
член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, генеральный директор
ул. Малая Пироговская, 1а, Москва, 119435, Российская Федерация
<https://orcid.org/0000-0001-9594-1134>

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина» Федерального медико-биологического агентства
Богомазова Александра Никитична
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
ул. Малая Пироговская, 1а, Москва, 119435, Российская Федерация
<https://orcid.org/0000-0003-1549-1984>

ABOUT THE AUTHORS

Helmholtz National Medical Research Eye Diseases Center
Neroeva Natalia V.
PhD, ophthalmologist of Retinal and optic nerve pathology department
Sadovaya-Chernogryazskaya str., 14/19, Moscow, 105062, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0003-1038-2746>

Helmholtz National Medical Research Eye Diseases Center
Balatskaya Natalya V.
PhD (Biology), leading researcher, head of the Immunology and virology Department
Sadovaya-Chernogryazskaya str., 14/19, Moscow, 105062, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0001-8007-6643>

Helmholtz National Medical Research Eye Diseases Center
Brilliantova Angelina G.
postgraduate student of Retinal and optic nerve pathology department
Sadovaya-Chernogryazskaya str., 14/19, Moscow, 105062, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0001-6424-8724>

Helmholtz National Medical Research Eye Diseases Center
Katargina Ludmila A.
MD, Professor, head of the Eye pathology in children department, deputy director
Sadovaya-Chernogryazskaya str., 14/19, Moscow, 105062, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0002-4857-0374>

Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical and Biological Agency
Kharitonov Anatoly E.
junior research associate of the Laboratory of cell biology;
Malaya Pirogovskaya str., 1a, Moscow, 119435, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0003-1420-1164>

Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical and Biological Agency
Lagarkova Maria A.
Academician of Russian Academy of Science, MD, Director
Malaya Pirogovskaya str., 1a, Moscow, 119435, Russian Federation.
<https://orcid.org/0000-0001-9594-1134>

Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical and Biological Agency
Bogomazova Alexandra N.
PhD (Biology), leading researcher
Malaya Pirogovskaya str., 1a, Moscow, 119435, Russian Federation
<https://orcid.org/0000-0003-1549-1984>