

УДК 576.53

Возможности использования плюрипотентных стволовых клеток для восстановления поврежденного пигментного эпителия сетчатки глаза

А. Е. Харитонов, А. В. Сурдина, О. С. Лебедева, А. Н. Богомазова, М. А. Лагарькова*

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, 119435, Москва, Малая Пироговская, 1а

*E-mail: maryalag@yahoo.com

Поступила в редакцию 19.03.2018

Принята к печати 02.07.2018

РЕФЕРАТ Пигментный эпителий сетчатки представляет собой монослой пигментированных гексагональных клеток, соединенных плотными контактами. Эти клетки составляют часть внешнего барьера между кровью и сетчаткой, защищают глаз от излишнего света, обладают важными секреторными функциями, а также поддерживают работу фоторецепторов, обеспечивая координацию множества регуляторных механизмов. Именно дегенерация пигментного эпителия является первопричиной многих дегенеративных заболеваний сетчатки глаза. Поиск надежных источников клеток для трансплантации пигментного эпителия сетчатки представляет крайне актуальную задачу. Плюрипотентные стволовые клетки (эмбриональные стволовые или индуцированные плюрипотентные) можно с высокой эффективностью дифференцировать в пигментный эпителий сетчатки, что открывает возможности для клеточной терапии при дегенерации сетчатки и может позволить замедлить развитие патологии и даже, возможно, вернуть пациенту зрение. Пионерские работы по трансплантации клеток пигментного эпителия сетчатки, дифференцированных из плюрипотентных стволовых клеток, проводимые в США и Японии, подтверждают необходимость развития и оптимизации подобных подходов к клеточной терапии. Для эффективного применения клетки пигментного эпителия, дифференцированные из плюрипотентных стволовых клеток, должны иметь набор функциональных свойств, характерный для клеток пигментного эпителия *in vivo*. В этом обзоре обобщен текущий статус доклинических и клинических исследований в области заместительной терапии пигментного эпителия сетчатки. На основании собственных и опубликованных данных проведено сравнение разных протоколов дифференцировки, обозначены медицинские проблемы, стоящие на пути к широкому применению пигментного эпителия сетчатки, дифференцированного из плюрипотентных стволовых клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА дифференцировка, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, клеточная терапия, клинические испытания, пигментный эпителий сетчатки, эмбриональные стволовые клетки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВМД – возрастная макулодистрофия; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; МКОЗ – максимально скорректированная острота зрения; МСК – мезенхимальные стволовые клетки; ПДС – пигментная дистрофия сетчатки; ПСК – плюрипотентные стволовые клетки; ПЭС – пигментный эпителий сетчатки; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ABCA4 – ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1) member 4, член 4 подсемейства А (ABC1) АТФ-связывающей кассеты; BEST-1 – bestrophin 1, бестрофин 1; CNV – copy number variations, вариация числа копий; NIC – никотинамид; НК – natural killers, естественные киллеры; PEDF – pigment epithelium-derived factor, фактор пигментного эпителия; bFGF – basic fibroblast growth factor, основной фактор роста фибробластов; VEGF – vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов.

ВВЕДЕНИЕ

Пигментный эпителий сетчатки (ПЭС) образован монослоем гексагональных эпителиальных клеток с большим числом меланосом, содержащих пигмент меланин (рис. 1). Базальной мембраной для пигментного эпителия служит внутренний слой пятислой-

ной мембраны Бруха. Ядра у клеток ПЭС размещены ближе к базальному полюсу, содержащему меньше меланосом. На апикальном полюсе ПЭС расположено множество меланосом и микроворсинок (ресничек), которые «укутывают» наружные сегменты фоторецепторных клеток. Различают длинные и короткие

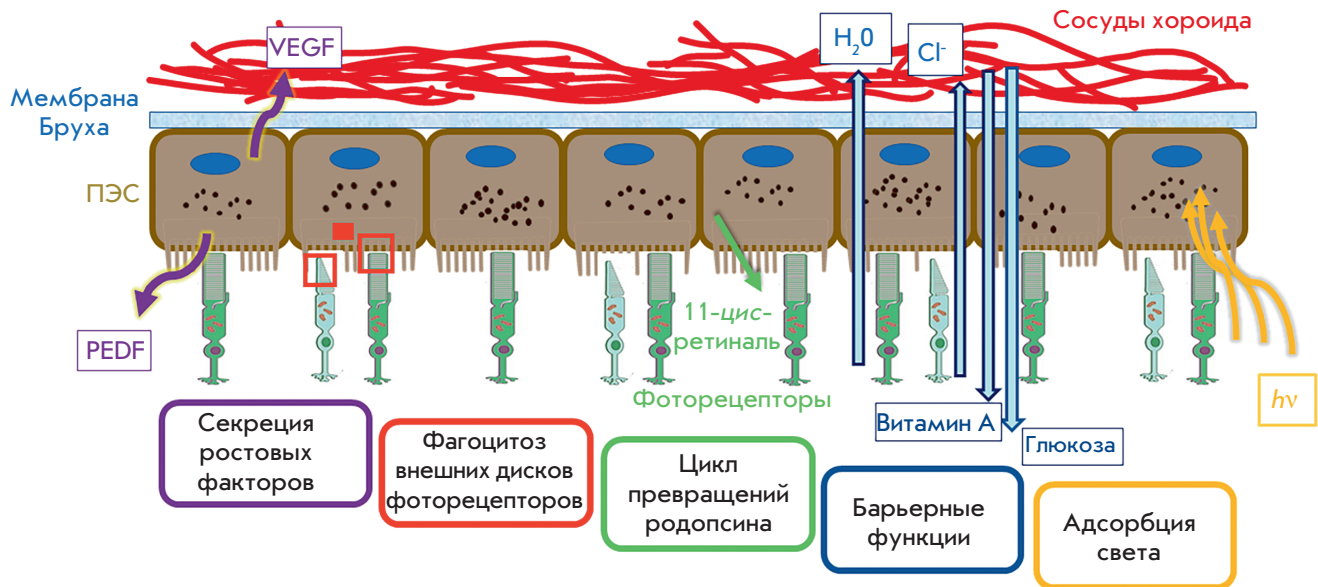


Рис. 1. Функции пигментного эпителия сетчатки глаза (по [4] с изменениями)

микроворсинки. Короткие микроворсинки соединяются с концами наружных сегментов фоторецепторов, а длинные расположены между внешними сегментами [1]. В области макулы каждая клетка ПЭС имеет контакты с 20–55 фоторецепторами [2]. Пространство между микроворсинками ПЭС и внешними сегментами фоторецепторов наполнено матриксом, который вместе с микроворсинками обеспечивает плотное прилегание сетчатки к ПЭС.

Функции ПЭС:

Поглощение света. Меланосомы ПЭС обеспечивают поглощение большей части света, не абсорбированного фоторецепторами. Поглощение света препятствует отражению и рассеиванию света по сетчатке, что позволяет сохранить контрастность и четкость изображения. Под действием света меланосомы мигрируют на апикальную сторону клеток, в микроворсинки, которые окружают внешние световоспринимающие сегменты фоторецепторов. В темноте меланосомы возвращаются обратно в центральную часть клетки при участии микрофиламентов и гормона меланотропина. Функцию поглощения света обеспечивают главным образом длинные микроворсинки [3]. Кроме того, ПЭС помогает рассеивать тепло в сетчатке, которое выделяется при поглощении света и в результате процесса зрительной фототрансдукции [2].

Фагоцитоз. Клетки ПЭС осуществляют фагоцитоз отработанных дисков фоторецепторов [5]. Каждая клетка ПЭС ежедневно фагоцитирует 2–4 тысячи отработанных дисков [6].

Осуществление зрительного цикла. Диски наружных сегментов фоторецепторов содержат белки опсины и отвечают за поглощение света. Опсин синтезируется во внутренних сегментах и транспортируется в наружные сегменты. Для осуществления зрительного цикла необходим родопсин. Он состоит из опсина, соединенного с 11-цис-ретиналем. При поглощении света ретиноаль изомеризуется из 11-цис-ретиноаля в транс-ретиноаль, а затем превращается в транс-ретинол. В ходе зрительного цикла фоторецепторы не могут превратить транс-ретинол обратно в 11-цис-ретиноаль, поэтому он транспортируется в ПЭС для реизомеризации, а затем возвращается в фоторецепторы [1].

Барьерная функция. Обеспечение выборочной поставки необходимых питательных веществ фоторецепторам от сосудистой оболочки и отвод продуктов распада в обратном направлении. ПЭС является второй частью гематоретинального барьера, который препятствует попаданию в сетчатку из хориокапилляров больших молекул. Первая часть этого барьера – эндотелий капилляров сетчатки [3, 5, 6].

Секреция гормонов и факторов роста. Клетки ПЭС поляризованы и секретируют различные цитокины и факторы роста в разных направлениях, что очень важно для функционирования хориокапилляров и сетчатки. Например, VEGF, который секретируется с базальной стороны клеток ПЭС, жизненно необходим хориокапиллярам, а PEDF и TGF-β, которые секретируются в основном апикальной стороной клеток ПЭС, необходимы в субретиальном пространстве [1, 2].

с ВМД. Постоперационное наблюдение в течение года не выявило значимых улучшений остроты зрения, хотя три пациента положительно оценивали свое состояние. Два пациента сообщили об ухудшении зрения, что, по мнению авторов, могло быть связано с постоперационным отслоением сетчатки и пролиферативной витреоретинопатией [20].

В работе Фалкнер-Рэдлер с соавт. (Falkner-Radler et al.) сравнивали эффективность аутотрансплантации лоскута ПЭС-хороид и субретинальной инъекции суспензии ПЭС в двух группах пациентов по семь человек каждая. По результатам 24-месячного наблюдения за пациентами обеих групп не обнаружено статистически значимых различий в тесте максимально корригированной остроты зрения (МКОЗ). Однако индивидуальные результаты в группах оказались неоднозначными. Так, и в первой, и второй группе зафиксировано как улучшение зрительной функции у отдельных пациентов, так и ухудшение остроты зрения [21].

В 2012 году Ван Зибург с соавт. (van Zeeburg et al.) сообщили о способности трансплантированного лоскута ПЭС-хороид поддерживать функцию макулы на протяжении длительного периода наблюдения с относительно низким уровнем осложнений и рецидивов. Эта работа основана на 7-летнем постоперационным наблюдением за 130 пациентами, у которых с 2001 по 2006 год были проведены операции по аутотрансплантации лоскута ПЭС-хороид (всего 133 глаза) [22]. Это исследование и его основные выводы критиковали в своем обзоре Сэйлер и Арамонт (Seiler and Aramant, 2012), указавшие на отсутствие контрольной группы и на незначительное количество глаз, которые действительно наблюдали после операции (9 глаз на 7-й год наблюдения) [23].

Таким образом, вопрос об эффективности и стабильности результата аутотрансплантации ПЭС остается дискуссионным. Несомненное преимущество метода состоит в отсутствии проблем гистосовместимости и необходимости иммуносупрессивной терапии. С другой стороны, аутотрансплантация не всегда приводит к предсказуемым результатам [24]. Не исключено, что клетки, пересаживаемые с незатронутого дегенерацией участка, уже имеют скрытые морфофункциональные изменения. Кроме того, трудность получения материала для аутотрансплантации со здоровых участков ограничивает возможности лечения на поздних стадиях заболевания.

Другим источником клеток для трансплантации ПЭС пациентам с макулодистрофией может быть донорская ткань с учетом гистосовместимости донор-реципиент. Как правило, пересаживают фетальный материал, хотя существуют сообщения о пересадке аллогенной ткани взрослых доноров.

Впервые аллогенный фетальный материал для пересадки ПЭС был использован в 1999 году при лечении 16 пациентов [25]. Иммуносупрессивную терапию в послеоперационный период тогда не использовали, и у 75% пациентов наблюдалось медленное отторжение трансплантированной ткани. Первое сообщение о пересадке ПЭС от взрослого донора вышло в 2001 году [26]. Эта операция была проведена 85-летней пациентке, которая скончалась спустя 4 месяца после процедуры. Сама операция к улучшению показателей зрения не привела. Таким образом, первые клинические трансплантации ПЭС с использованием аллогенных донорских тканей оказались достаточно неудачными.

Первые внушающие оптимизм аллогенные трансплантации были проведены американским хирургом Норманом Радтке (Norman D. Radtke). В 2004 году им опубликовано сообщение о трансплантации комплекса фетальной нейроретины/ПЭС 64-летней женщине с пигментной дистрофией сетчатки (ПДС) [27]. Эта операция привела к улучшению остроты зрения у пациентки при 5-летнем наблюдении. Далее в 2008 году такая же операция тем же хирургом была проведена 10 пациентам с ПДС, и у семи привела к улучшению остроты зрения. При этом у одного из пациентов в послеоперационный период острота зрения не изменилась, а у двух зрение ухудшилось [28].

В 2007 году другой группой хирургов-офтальмологов была проведена пересадка аллогенной ткани ПЭС взрослого человека 12 пациентам с экссудативной макулодистрофией. Пациенты проходили курс иммуносупрессивной терапии длительностью до 6 месяцев. Постоперационное наблюдение в течение первого года показало улучшение остроты зрения, чтения и других параметров зрительной функции, хотя статистические методы этих различий не подтвердили [24].

Таким образом, несмотря на первоначально заявленную перспективность, результаты трансплантации аутологичной или донорской ткани при ВМД оказались противоречивыми. При аутотрансплантации есть риск, связанный с хирургическим вмешательством, предполагающим получение здоровой ткани в незатронутом процессами дегенерации участке сетчатки и дальнейшие манипуляции, связанные с внедрением аутотрансплантата в область макулы [29]. К тому же существует возможность продолжения дегенерации аутотрансплантированной здоровой ткани. Аллогенная трансплантация неизбежно сопровождается проблемами с получением донорского материала, гистосовместимостью донор-реципиент и необходимостью иммуносупрессивной терапии, которая, в свою очередь, связана со множеством побочных эффектов.

Мы хотели бы специально отметить, что описания экспериментов с пересадкой мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для лечения заболеваний глаз находятся за рамками данного обзора. Заметим только, что уже достаточно общепринятым считается, что МСК в этом случае могут оказывать лишь паракринный эффект, так как способностью к дифференцировке вне мезодермального зародышевого листка эти клетки не обладают [30, 31].

В конце XX века из внутренней клеточной массы бластоцист получили культуры эмбриональных стволовых клеток мыши и человека (ЭСК) [32, 33]. В 2006 году создали индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) – получаемые путем генетического репрограммирования дифференцированных клеток аналоги ЭСК [34]. ЭСК и ИПСК являются плюрипотентными, т.е. они способны к неограниченному росту и самообновлению, а также к дифференцировке в клетки любых типов. Именно плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) могут стать решением проблемы источника клеток для трансплантации, с которой столкнулись исследователи в рамках клинических испытаний по ауто- и аллогенной трансплантации ПЭС. В последние годы создано несколько протоколов направленной дифференцировки ЭСК и ИПСК в ПЭС, а некоторые были опробованы в клинических испытаниях [5, 35–39]. Стоит отметить, что анатомо-морфологические особенности глаза (относительно небольшие размеры, парность органа, хорошо разработанные методы диагностики и инструментального мониторинга, возможная иммунная привилегированность и наличие гематоретинального барьера) делают его удобной мишенью для отработки технологии доставки материала при клеточной терапии с использованием производных из плюрипотентных клеток [40].

НАПРАВЛЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ПЭС ИЗ ПСК

Направленная дифференцировка ПЭС из ИПСК и дальнейшее применение полученного материала в клинической практике представляют интерес для многих исследователей (например, [11, 41]). Сравниваются различные протоколы дифференцировки, их эффективность и временные затраты. Кратко рассмотрим некоторые протоколы, которые на сегодняшний день нам кажутся наиболее эффективными.

Незначительные количества клеток пигментного эпителия сетчатки могут образовываться при спонтанной дифференцировке плюрипотентных стволовых клеток человека [35]. При удалении из культуральной среды фактора FGF2, необходимого для поддержания плюрипотентного состояния в культуре, плюрипотентные стволовые клетки че-

ловека, культивируемые на подложке из эмбриональных фибробластов мыши, матригеле, полилизине или ламинине, способны к образованию клеток пигментного эпителия [35, 42, 43]. Через 10–12 недель спонтанной дифференцировки образуются небольшие пигментированные области, которые затем механически отделяют от остальной массы клеток, получая практически чистую культуру клеток пигментного эпителия (>99% чистоты). Различные модификации состава среды культивирования и времени дифференцировки позволяют повысить выход клеток пигментного эпителия [44, 45]. Однако для получения культур, в значительной степени обогащенных клетками пигментного эпителия сетчатки, без трудоемкого механического отбора пигментированных колоний требуются эффективные протоколы направленной дифференцировки. Как показали работы последних лет, из ИПСК и ЭСК можно получать *in vitro* клетки пигментного эпителия сетчатки, морфологически и функционально соответствующие таким клеткам *in vivo*. Так, в работе Лич с соавт. (Leach et al.) сравнивали эффективность протоколов спонтанной и направленной дифференцировки в ПЭС на пяти разных линиях ИПСК, полученных от разных доноров и различных типов клеток. Показано, что на способность к эффективной дифференцировке может влиять исходный источник донорских клеток, метод репрограммирования и используемый протокол [46], что еще раз подчеркивает необходимость стандартизации процедуры получения ПЭС из ПСК для клинического применения.

Одними из первых направленную дифференцировку ПСК в ПЭС осуществили Хирами с соавт. (Hirami et al.) [47]. ИПСК мыши и человека в суспензионной культуре обрабатывали антагонистами Wnt и Nodal, что способствовало дифференцировке в пигментный эпителий.

Поскольку клетки ПЭС дифференцируются из нейроэктодермы и имеют общие характеристики с нейрональными клетками сетчатки *in vivo*, был разработан двухстадийный протокол дифференцировки для получения клеток пигментного эпителия из нейроэпителиальных предшественников [48–51]. Агрегаты ЭСК первоначально культивировали в суспензии в среде для нейроэпителиальной дифференцировки. Затем нейроэпителиальные предшественники наращивали и дифференцировали в предполагаемые клетки пигментного эпителия, заменяя FGF2 в культуральной среде на добавку B27. Первые клетки, подобные клеткам пигментного эпителия сетчатки, появлялись через 4 недели дифференцировки, и через 8 недель количество клеток, пригодных для субкультивирования, становилось значительным. Этот двухступенчатый метод более

эффективен по сравнению с методом спонтанной дифференцировки.

Основываясь на роли никотинамида (NIC) в метаболизме, выживаемости, пластичности и дифференцировке клеток, Идельсон с соавт. (Idelson et al.) исследовали влияние NIC на дифференцировку ЭСК в клетки пигментного эпителия [5]. Для индукции дифференцировки в клетки ПЭС кластеры ЭСК, полученные с помощью коллагеназы, культивировали в суспензии в среде для ЭСК с добавлением заменителя сыворотки, NIC, и в присутствии или без активина А (член суперсемейства TGF- β , который направляет дифференцировку глазного бокала в эмбриогенезе) [52]. Пигментированные области появились через 4 недели после индукции, и примерно половина кластеров при культивировании в среде, содержащей как NIC, так и активин А, были пигментированы. Показано, что NIC в присутствии активина А эффективно индуцирует и увеличивает эффективность дифференцировки ЭСК в клетки пигментного эпителия.

Описанные протоколы предполагают длительное время дифференцировки и на выходе дают низкую чистоту популяции, при которой необходимы дополнительные трудоемкие манипуляции для очистки клеток нужного типа. Бухгольц с соавт. (Buchholz et al.) предложили более быстрый и эффективный протокол. Данный метод направленной дифференцировки ЭСК в клетки пигментного эпителия основан на сочетании факторов, индуцирующих дифференцировку сетчатки (IGF1, Noggin, Dkk1, bFGF), и других факторов (NIC, активин А, SU5402 и вазоактивный пептид кишечника (vasoactive intestinal peptide, VIP)), причем все факторы добавляли в разное строго определенное время [44]. Уже через 14 дней после начала дифференцировки около 80% клеток в культуре представляли собой клетки пигментного эпителия. Благодаря высокой эффективности и скорости этот протокол, по мнению авторов, может применяться для быстрого наращивания больших количеств клеток, необходимых для трансплантации (существуют незначительные вариации данного протокола, предложенные другими авторами, например Генг с соавт. (Geng et al.) [53]). Похожий протокол был предложен Фольтцем и Клеггом (Foltz and Clegg), однако вместо VIP они использовали CHIR99021 [54].

Чтобы идентифицировать новые соединения, которые способствуют дифференцировке ИПСК в ПЭС, методом количественного ПЦР-скрининга маркеров дифференцировки ПЭС на культуре ИПСК был проведен анализ химической библиотеки [39]. В результате нашли хетомин – вещество, потенциально активирующее дифференцировку. Затем, с помощью репортерной конструкции (GFP под контролем

ПЭС-специфического энхансера тирозиназы) подтвердили, что хетомин – ингибитор фактора, индуцируемого гипоксией (HIF), существенно увеличивает дифференцировку ПЭС из ПСК. Сочетание хетомина с никотинамидом привело к дифференцировке более 50% ИПСК в ПЭС. Молекулярные пути, по которым хетомин способствует дифференцировке ПЭС, пока остаются неизвестными.

Для получения клеток сетчатки Жу с соавт. (Zhu et al.) использовали также такие индукторы, как IWR1, SB431542 и IGF1, и получили из ИПСК функциональные фоторецепторы и пигментный эпителий сетчатки с соблюдением стандартов GMP. Показали, что полученные производные способны интегрироваться в сетчатку мышей с иммунодефицитом [55].

В нашей лаборатории было опробовано несколько методов дифференцировки ПСК в ПЭС. Сравнение нескольких протоколов дифференцировки привело нас к следующим выводам:

1. По нашему опыту, наилучшим протоколом, стабильно работающим для всех опробованных линий ИПСК и ЭСК, является протокол [39] с хетоминном и никотинамидом. Добавление активина в среду в этом случае нежелательно, так как уменьшает выживаемость клеток и эффективность направленной дифференцировки (неопубликованные данные). Дифференцировка занимает не менее 30 дней, но этот «временной проигрыш» компенсируется большим числом получаемых пигментированных клеток и их дальнейшей быстрой пролиферацией.

2. Клетки пигментного эпителия очень чувствительны к внеклеточному матриксу, от типа и качества матрикса зависит их выживаемость, скорость созревания и полнота достижения фенотипических и функциональных характеристик, свойственных этому типу клеток *in vivo* [56, 57]. Естественной подложкой для клеток пигментного эпителия сетчатки является мембрана Бруха. Согласно нашим экспериментальным данным, матригель в лабораторных условиях – самая подходящая подложка для быстрого наращивания незрелых, быстро делящихся клеток ПЭС. Для полного достижения гексагональной морфологии и правильной поляризации ПЭС, скорее всего, необходимо, чтобы жидкость омывала слой эпителиальных клеток с двух сторон – с апикальной и базальной. Для этого ПЭС обычно культивируют в камерах – трансвеллах, где среда находится и над, и под мембраной, на которой растут клетки. Репрезентативная фотография ПЭС, дифференцированных из ИПСК и имеющих характерную морфологию и пигментацию, представлена на рис. 2.

Одна из наиболее важных функциональных характеристик клеток пигментного эпителия сетчатки – способность секретировать PEDF и VEGF, а также

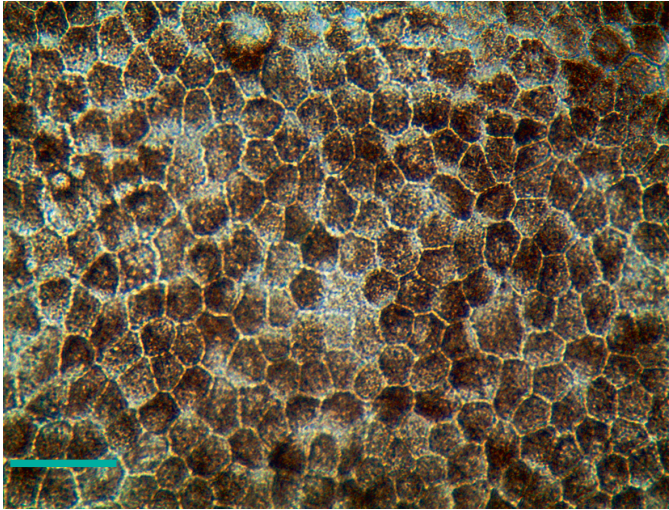


Рис. 2. Клетки ПЭС, дифференцированные из ИПСК здорового донора. Клетки культивировали в течение 3 месяцев в камере Transwell. Фазовый контраст. Масштабная линейка 100 мкм

образовывать внеклеточный матрикс [4], взаимодействовать с внешними сегментами фоторецепторов и фагоцитировать их [38]. Именно эти физиологические свойства проверяют обычно для доказательства функциональности дифференцированного ПЭС. Кроме того, проверяют экспрессию генов белков, характерных для ПЭС (например, RPE 65, BEST1, тирозиназа, MITF1, ZO-1 и др.). Очень важной характеристикой ПЭС является трансэпителиальный потенциал, отражающий барьерные свойства эпителия. Этот потенциал можно измерить с помощью кондуктометра.

Функциональность дифференцированного ПЭС *in vivo* подтверждают на животных моделях, в первую очередь, на крысах линии RCS (Royal College of Surgeons) с рецессивно наследуемой дистрофией сетчатки [5, 38, 58], а также на кроликах-альбиносах [59]. В многочисленных работах показано, что у животных после пересадки пигментного эпителия сохраняются его гистологические и физиологические признаки. При помощи электроретинографии показана функциональность пересаженного ПЭС (обзор [60]).

КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ПЭС, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО ИЗ ПСК

Первые клинические испытания, в которых использовали клетки ПЭС, произведенные из плюрипотентных стволовых клеток, провели американские специалисты Шварц с соавт. (Schwartz et al.) в 2011 году. Для получения ПЭС использовали ЭСК линии MA09. Эти испытания были зарегистрированы в базе данных ClinicalTrials.gov под идентификаторами

НСТ01345006 (болезнь Штаргардта) и НСТ01344993 (атрофическая ВМД). На первом этапе одному пациенту с болезнью Штаргардта и одному пациенту с атрофической ВМД была проведена субретинальная инъекция 50000 клеток ПЭС. Результаты постоперационного наблюдения не выявили побочных эффектов на протяжении 4 месяцев, в том числе гиперпролиферации и онкогенности. У обоих пациентов острота зрения улучшилась по объективным показателям [61]. На следующем этапе на клинической когорте из 18 пациентов опробовали различные дозировки трансплантируемого материала: 50×10^3 , 100×10^3 и 150×10^3 клеток. В период постоперационного наблюдения в течение 22 месяцев у 13 пациентов отмечено увеличение пигментации сетчатки; у 10 – улучшение зрения [14].

Протокол Шварца с соавт. (Schwartz et al.) был использован в 2012 году корейскими офтальмологами в клиническом испытании НСТ01625559. Незначительные модификации протокола касались скрининга онкогенности и схемы постоперационной иммуносупрессивной терапии. Двум пациентам с болезнью Штаргардта и двум пациентам с ВМД была осуществлена субретинальная инъекция 40×10^3 клеток ПЭС, дифференцированных из ЭСК линии MA09. С использованием таблиц Early Treatment Diabetic Retinopathy Study и теста МКОЗ улучшение зрения зафиксировано у трех пациентов. В связи с развитием побочных эффектов у одного пациента спустя 4 недели после операции была отменена иммуносупрессивная терапия, в результате состояние сетчатки вернулось на дооперационный уровень. В целом, подтверждена возможность и предварительная безопасность клеточной терапии дегенерации макулы различной этиологии с использованием ПЭС, дифференцированного из ЭСК. В то же время указано на необходимость дальнейших наблюдений, клинических испытаний и исследований [12].

В 2012 году в Университетском колледже Лондона компанией Pfizer был дан старт первой фазе клинического испытания по пересадке ЭСК-производного ПЭС, выращенного на мембране из полиэфира (НСТ01691261). В этом испытании трансплантацию проводили пациентам с влажной формой ВМД с прогрессирующей потерей зрения. Сейчас проводится набор пациентов-участников первой фазы в следующее клиническое испытание (НСТ03102138), в котором запланировано 4-летнее наблюдение и оценка безопасности трансплантации, проведенной ранее.

В 2015 году в Китае тремя различными университетами было объявлено о начале первой фазы клинических испытаний субретинальной трансплантации ПЭС, дифференцированного из ЭСК (НСТ02749734, НСТ02755428, НСТ03046407). В каждом испытании

операцию проведут 10–15 пациентам с различными формами дистрофии сетчатки. Предполагается оценить безопасность и клинический эффект трансплантации.

В Федеральном университете Сан-Паулу (Бразилия) под руководством проф. Рубенса Белфорта (Rubens Belfort) с 2015 года проходит двухэтапное клиническое испытание, в котором изучают возможности трансплантации ЭСК-производного ПЭС (NCT02903576). На первом этапе запланирована трансплантация ПЭС в виде суспензии, на второй – в виде монослоя на полимерном субстрате. Цель испытания – сравнение эффективности двух способов трансплантации, а также оценка безопасности и применимости в клинике.

В настоящее время в США компанией Regenerative Patch Technologies под руководством Джейн Лебковски (Jane Lebkowski) осуществляется набор пациентов для участия в фазе I/II клинических испытаний по трансплантации ЭСК-производного ПЭС на париленовой мембране. Запланированы испытания на 20 пациентах, распределенных по двум группам в зависимости от стадии развития «сухой» ВМД (NCT02590692).

В сотрудничестве медицинских групп США и Израиля дан старт испытанию коммерческого клеточного продукта OpRegen® – суспензии клеток ПЭС, полученных из ЭСК человека. В данном испытании будут участвовать 15 пациентов с атрофической ВМД, которым проведут трансплантацию данного продукта в субретинальное пространство с последующей процедурой витрэктомии (NCT02286089).

Анализ базы данных ClinicalTrials.gov показывает, что основным объектом клинических испытаний в мире являются клетки, полученные из ЭСК. Первое и пока единственное опубликованное клиническое испытание ПЭС, дифференцированных из ИПСК, осуществлено в Японии [62]. Дисбаланс в пользу ЭСК может быть связан с большими опасениями биомедицинского сообщества в отношении ИПСК. Создание ИПСК требует гораздо большего числа воздействий на клетку, чем получение линии ЭСК. Существуют сомнения в стабильности генома ИПСК, в полноте репрограммирования и дифференцировки. ИПСК не представлены широко в клинических испытаниях также потому, что это относительно новый тип клеток, впервые полученный в 2006 году, в то время как ЭСК мыши изучают на 25 лет дольше, а ЭСК человека – на восемь. По нашему мнению, в течение трех-четырёх лет стоит ожидать увеличения числа испытаний продуктов ИПСК, особенно в Японии и Китае.

Согласно федеральному закону от 23.06.2016 г. № 180-ФЗ, ЭСК человека, наряду с фетальными

клетками, не могут использоваться в качестве источника клеточных продуктов. Как бы ни относились авторы обзора к подобному запрету, российские исследователи поставлены перед фактом, что ИПСК остаются практически единственным источником клеток для получения ПЭС.

Первое клиническое испытание ПЭС, дифференцированных из ИПСК, проведено в Японии [62]. Японские медики трансплантировали монослой ПЭС, дифференцированного из ИПСК, пациентке 70 лет с неоваскулярной возрастной ВМД. Пациентке была проведена операция, включавшая удаление неоваскулярной мембраны и трансплантацию аутологичного ПЭС под сетчатку. Через год после операции пересаженный слой ПЭС оставался интактным, острота зрения не улучшилась, но и не ухудшилась, и присутствовал цистовидный макулярный отек. Аутологичные ИПСК были получены с использованием неинтегрирующих плазмидных векторов и дифференцированы в ПЭС по ранее опубликованному протоколу, позволяющему получить функциональный ПЭС [62]. Качество, безопасность ИПСК и полученных из них клеток ПЭС подвергали тщательному анализу перед трансплантацией. Кроме анализа морфологии и экспрессии соответствующих маркеров, было проведено кариотипирование традиционным GTG-бэндингом и полногеномным SNP-анализом, а также полногеномное секвенирование, полногеномный анализ транскриптома и метилирования ДНК. В отсутствие туморогенности ПЭС убедились, трансплантируя ПЭС иммунодефицитным мышам NOG.

Пионерская трансплантация ПЭС, дифференцированного из ИПСК, безусловно, стала огромным шагом для регенеративной медицины. Тем не менее, она оставила и много нерешенных вопросов. Следует отметить, что изначально планировали трансплантацию ПЭС двум пациентам, но ИПСК одного из них не прошли контроль качества, так как в них выявили CNV, появившиеся в процессе репрограммирования. Также 10 из 20 клонов ИПСК, отобранных для дальнейшего анализа, содержали интегрированные в геном плазмиды, т.е. получение ИПСК с помощью плазмид следует признать не самым безопасным способом репрограммирования [62]. Другими способами получения могли бы стать не интегрирующиеся в геном вирусы, *in vitro* синтезированная РНК, репрограммирование с помощью малых молекул [63–65].

Пока международное сообщество не выработало однозначных рекомендаций ни по методам получения, ни по необходимым и достаточным методам характеристики клеток-производных ПСК. Необходимым условием для полномасштабного применения дифференцированных из ПСК производных

является оценка влияния различных протоколов получения и последующего культивирования на генетическую и эпигенетическую стабильность клеток с секвенированием и профилем метилирования всего генома, анализом экспрессии, а также исследования молекулярной основы возможных аберраций [66]. Кроме того, сейчас активно отрабатываются хирургические трансплантации и инструменты, позволяющие сделать эту процедуру максимально безопасной для пациентов [67].

Аутологичная трансплантация производных ИПСК – очень дорогой и долгий метод. Аллогенная трансплантация, как уже говорилось выше, требует иммуносупрессии. Казалось, что решением вопроса могло бы стать создание банков ИПСК от здоровых доноров, гомозиготных по генам главного комплекса гистосовместимости HLA [68]. Каждая такая гомозигота подойдет любой гетерозиготе, в которой есть один аллель того же гаплотипа. Рассчитано, что 20 наиболее часто встречающихся гомозиготных HLA гаплотипа европеоидной популяции, идентифицированных после скрининга 26000 индивидов, будет подходить для 50% населения [68]. Создание банка таких линий ИПСК началось как национальная инициатива в Японии в 2012 году, и ИПСК с наиболее часто встречающимися «японскими» гаплотипами уже доступны для использования в Центре по исследованию и применению ИПСК в Киото [69]. Тем не менее, появившаяся в прошлом году работа [70] слегка снизила оптимизм по этому вопросу. Оказалось, что при взаимодействии иммунных клеток, гетерозиготных по HLA, с гомозиготными по HLA клетками трансплантата NK-клетки реципиента способны вызывать отторжение клеток, полученных из гомозиготных ИПСК, путем распознавания «отсутствия своего» [70]. Этот вопрос требует дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пока не существует апробированных методов, позволяющих вернуть или улучшить зрение пациентам с начавшейся дегенерацией сетчатки. Одним из таких методов может быть трансплантация тканей сетчатки глаза, в частности пигментного эпителия. Подход, связанный с трансплантацией ПЭС, полученного из ПСК человека, уже применяется в нескольких клинических испытаниях. Пигментный эпителий сетчатки может быть получен при направленной дифференцировке ЭСК и ИПСК человека и отобран на основании морфологических критериев и накопления коричневых гранул пигмента. Для широкого применения ПЭС, дифференцированного из ПСК, необходимо решить еще много вопросов. В частности, должны быть отработаны методы сортировки ПЭС, необходимые и достаточные методики доказательства соответствия дифференцированных клеток клеткам ПЭС, методы и протоколы доставки клеток, операционные технологии и критерии отбора пациентов, которым показана трансплантация ПЭС. Так, при прогрессировании заболевания наблюдается дегенерация и ПЭС, и фоторецепторов, и для получения эффективного результата возникает необходимость трансплантации и ПЭС, и фоторецепторов. Кроме того, персонализированная терапия аутологичными клетками вряд ли станет общедоступной медицинской процедурой в ближайшие десятилетия из-за трудоемкости и высокой стоимости получения и дифференцировки пациентспецифичных ИПСК. Поиск подходов к возможности аллогенной трансплантации производных ИПСК позволил бы удешевить и ускорить получение клеток ПЭС для трансплантации при дегенерации сетчатки глаза. ●

*Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда (№ 14-15-00930).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jones M.K., Lu B., Girman S., Wang S. // Prog. Retin. Eye Res. 2017. V. 57. P. 1–27.
- Nazari H., Zhang L., Zhu D., Chader G.J., Falabella P., Stefanini F., Rowland T., Clegg D.O., Kashani A.H., Hinton D.R., et al. // Prog. Retin. Eye Res. 2015. V. 48. P. 1–39.
- Diniz B., Thomas P., Thomas B., Ribeiro R., Hu Y., Brant R., Ahuja A., Zhu D., Liu L., Koss M., et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2013. V. 54. № 7. P. 5087–5096.
- Strauss O. // Physiol. Rev. 2005. V. 85. P. 845–881.
- Idelson M., Alper R., Obolensky A., Ben-Shushan E., Hemo I., Yachimovich-Cohen N., Khaner H., Smith Y., Wiser O., Gropp M., et al. // Cell. Stem Cell. 2009. V. 5. № 4. P. 396–408.
- Alexander P., Thomson H.A., Luff A.J., Lotery A.J. // Eye. 2015. V. 29. P. 992–1002.
- Brandl C., Zimmermann S.J., Milenkovic V.M., Rosendahl S.M., Grassmann F., Milenkovic A., Hehr U., Federlin M., Wetzel C.H., Helbig H., et al. // Neuromolecular Med. 2014. V. 16. № 3. P. 551–564.
- Tang Z., Zhang Y., Wang Y., Zhang D., Shen B., Luo M., Gu P. // J. Transl. Med. 2017. V. 15. № 1. P. 99–111.
- Parameswaran S., Krishnakumar S. // Indian J. Ophthalmol. 2017. V. 65. № 3. P. 177–183.
- Lukovic D., Artero Castro A., Delgado A.B., Bernal Mde L., Luna Pelaez N., Díez Lloret A., Perez Espejo R., Kamenarova K., Fernández Sánchez L., Cuenca N., et al. // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 12910.
- Zhao C., Wang Q., Temple S. // Development. 2017. V. 144. № 8. P. 1368–1381.
- Song W.K., Park K.-M., Kim H.-J., Lee J.H., Choi J., Chong S.Y., Shim S.H., Del Priore L.V., Lanza R. // Stem Cell Repts. 2015. V. 4. № 5. P. 860–872.
- Allikmets R., Shroyer N.F., Singh N., Seddon J.M., Lewis R.A., Bernstein P.S., Peiffer A., Zabriskie N.A., Li Y., Hutchin-

- son A., et al. // *Science*. 1997. V. 277. № 5333. P. 1805–1807.
14. Schwartz S.D., Regillo C.D., Lam B.L., Elliott D., Rosenfeld P.J., Gregori N.Z., Hubschman J.P., Davis J.L., Heilwell G., Spirn M., et al. // *Lancet*. 2015. V. 385. № 9967. P. 509–516.
 15. Battu R., Verma A., Hariharan R., Krishna S., Kiran R., Jacob J., Ganapathy A., Ramprasad V.L., Kumaramanickavel G., Jeyabalan N., et al. // *Biomed. Res. Int.* 2015. V. 2015. Article ID 940864.
 16. Li Y., Chan L., Nguyen H.V., Tsang S.H. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. V. 854. P. 549–555.
 17. Oshima H., Iwase T., Ishikawa K., Yamamoto K., Terasaki H. // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 5. e0177241.
 18. Алпатов С.А., Шуко А.Г., Малышев В.В. Аутоотрансплантация лоскута пигментного эпителия сетчатки и хориоидеи при эксудативной возрастной макулодистрофии // РМЖ «Клиническая офтальмология». 2007. № 1. С. 7.
 19. Binder S., Stolba U., Krebs I., Kellner L., Jahn C., Feichtinger H., Povelka M., Frohner U., Kruger A., Hilgers R.D., et al. // *Am. J. Ophthalmol.* 2002. V. 133. № 2. P. 215–225.
 20. van Meurs J.C., ter Averst E., Hofland L.J., van Hagen P.M., Mooy C.M., Baarsma G.S., Kuijpers R.W., Boks T., Stalmans P. // *British J. Ophthalmol.* 2004. V. 88. № 1. P. 110–113.
 21. Falkner-Radler C.I., Krebs I., Glittenberg C., Povazay B., Drexler W., Graf A., Binder S. // *British J. Ophthalmol.* 2011. V. 95. P. 370–375.
 22. van Zeeburg E.J., Maaijwee K.J., Missotten T.O., Heimann H., van Meurs J.C. // *Am. J. Ophthalmol.* 2012. V. 153. P. 120–127.
 23. Seiler M.J., Aramant R.B. // *Prog. Retinal Eye Res.* 2012. V. 31. № 6. P. 661–687.
 24. Tezel T.H., Del Priore L.V., Berger A.S., Kaplan H.J. // *Am. J. Ophthalmol.* 2007. V. 143. № 4. P. 584–595.
 25. Igvare PV., Gouras P., Dalfgard Kopp E. // *Eur. J. Ophthalmol.* 1999. V. 9. P. 217–230.
 26. Del Priore L.V., Kaplan H.J., Tezel T.H., Hayashi N., Berger A.S., Green W.R. // *Am. J. Ophthalmol.* 2001. V. 131. P. 472–480.
 27. Radtke N.D., Aramant R.B., Seiler M.J., Petry H.M., Pidwell D. // *Arch. Ophthalmol.* 2004. V. 122. P. 1159–1165.
 28. Radtke N.D., Aramant R.B., Petry H.M., Green P.T., Pidwell D.J., Seiler M.J. // *Am. J. Ophthalmol.* 2008. V. 146. P. 172–182.
 29. Binder S., Stanzel B.V., Krebs I., Glittenberg C. // *Prog. Retin. Eye Res.* 2007. V. 26. № 5. P. 516–554.
 30. Meyer U., Meyer T., Handschel J., Wiesmann H.P. *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Berlin, Heidelberg, Leipzig, Germany: Springer-Verlag, 2009. P. 179 (total 1048).
 31. Scuteri A., Miloso M., Foudah D., Orciani M., Cavaletti G., Tredici G. // *Curr Stem Cell Res Ther.* 2011. V. 6. № 2. P. 82–92.
 32. Evans M.J., Kaufman M.H. // *Nature*. 1981. V. 292. P. 154–156.
 33. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. // *Science*. 1998. V. 282. № 5391. P. 1145–1147.
 34. Takahashi K., Yamanaka S. // *Cell*. 2006. № 126. P. 663–676.
 35. Klimanskaya I., Hipp J., Rezaei K.A., West M., Atala A., Lanza R. // *Cloning Stem Cells*. 2004. V. 6. P. 217–245.
 36. Osakada F., Ikeda H., Mandai M., Wataya T., Watanabe K., Yoshimura N., Akaike A., Sasai Y., Takahashi M. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 215–224.
 37. Lu B., Malcuit C., Wang S. // *Stem Cells*. 2009. V. 27. P. 2126–2135.
 38. Kamao H., Mandai M., Okamoto S., Sakai N., Suga A., Sugita S., Kiryu J., Takahashi M. // *Stem Cell Repts.* 2014. V. 2. № 2. P. 205–218.
 39. Maruotti J., Sripathi S.R., Bharti K., Fuller J., Wahlin K.J., Ranganathan V., Sluch V.M., Berlinicke C.A., Davis J., Kim C., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. P. 10950–10955.
 40. Leach L.L., Clegg D.O. // *Stem Cells*. 2015. V. 33. P. 2363–2373.
 41. Achberger K., Haderspeck J.C., Kleger A., Liebau S. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2018. pii: S0169-409X(18)30108-X.
 42. Rowland T.J., Blaschke A.J., Buchholz D.E., Hikita S.T., Johnson L.V., Clegg D.O. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2013. V. 7. № 8. P. 642–653.
 43. Лагарькова М.А., Шилов А.Г., Губанова Н.И., Прохорович М.А., Киселев С.Л. // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2011. Т. 4. С. 203–206.
 44. Buchholz D.E., Pennington B.O., Croze R.H., Hinman C.R., Coffey P.J., Cleg D.O. // *Stem Cells Transl. Med.* 2013. V. 2. № 5. P. 384–393.
 45. Shutova M.V., Surdina A.V., Ischenko D.S., Naumov V.A., Bogomazova A.N., Vassina E.M., Alekseev D.G., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. // *Cell Cycle*. 2016. V. 15. № 7. P. 986–997.
 46. Leach L.L., Croze R.H., Hu Q., Nadar V.P., Clevenger T.N., Pennington B.O., Gamm D.M., Clegg D.O. // *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 2016. V. 32. № 5. P. 317–330.
 47. Hiram Y., Osakada F., Takahashi K., Okita K., Yamanaka S., Ikeda H., Yoshimura N., Takahashi M. // *Neurosci. Lett.* 2009. V. 458. № 3. P. 126–131.
 48. Cho M.S., Kim S.J., Ku S.Y., Park J.H., Lee H., Yoo D.H., Park U.C., Song S.A., Choi Y.M., Yu H.G. // *Stem Cell. Res.* 2012. V. 9. № 2. P. 101–109.
 49. Lamba D.A., McUsic A., Hirata R.K., Wang P.R., Russell D., Reh T.A. // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 1. P. e8763.
 50. Zhu D., Deng X., Spee C., Sonoda S., Hsieh C.L., Barron E., Pera M., Hinton D.R. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011. V. 52. № 3. P. 1573–1585.
 51. Zhu Y., Carido M., Meinhardt A., Kurth T., Karl M.O., Ader M., Tanaka E.M. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 1. P. e54552.
 52. Fuhrmann S., Levine E.M., Reh T.A. // *Development*. 2000. V. 127. № 21. P. 4599–4609.
 53. Geng Z., Walsh P.J., Truong V., Hill C., Ebeling M., Kaphahn R.J., Dutton J.R. // *PLoS ONE*. 2017. V. 12. № 3. P. e0173575.
 54. Foltz L.P., Clegg D.O. // *J. Visual. Exp.: JoVE*. 2017. № 128. P. 56274.
 55. Zhu J., Reynolds J., Garcia T., Cifuentes H., Chew S., Zeng X., Lamba D.A. // *Stem Cells Transl. Med.* 2018. V. 7. № 2. P. 210–219.
 56. Tezel T.H., Del Priore L.V. // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1997. V. 253. P. 41–47.
 57. Feng W., Zheng J.J., Lutz D.A., McLaughlin B.J. // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2003. V. 241. P. 232–240.
 58. Mullen R.J., Lavail M.M. // *Science*. 1976. V. 192. P. 799–801.
 59. Reyes A.P., Petrus-Reurer S., Antonsson L., Stenfelt S., Bartuma H., Panula S., Mader T., Douagi I., André H., Hovatta Q. // *Stem Cell Reports*. 2016. V. 6. № 1. P. 9–17.
 60. da Cruz L., Chen F.K., Ahmado A., Greenwood J., Coffey P. // *Prog. Retin. Eye Res.* 2007. V. 26. № 6. P. 598–635.
 61. Schwartz S.D., Hubschman J.P., Heilwell G., Franco-Cardenas V., Pan C.K., Ostrick R.M., Mickunas E., Gay R., Klimanskaya I., Lanza R. // *Lancet*. 2012. V. 379. № 9817. P. 713–720.
 62. Mandai M., Watanabe A., Kurimoto Y., Hiram Y., Morinaga C., Daimon T., Fujihara M., Akimaru H., Sakai N., Shibata Y., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2017. V. 376. № 11. P. 1038–1046.
 63. Fusaki N., Ban H., Nishiyama A., Saeki K., Hasegawa M. // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 2009. V. 85. № 8. P. 348–362.
 64. Warren L., Manos P. D., Ahfeldt T., Loh Y.H., Li H., Lau F., Ebina W., Mandal P.K., Smith Z.D., Meissner A., et al. // *Cell Stem Cell*. 2010. № 7. P. 1–13.
 65. Hou P., Li Y., Zhang X., Liu C., Guan J., Li H., Zhao T., Ye

- J., Yang W., Liu K., et al. // *Science*. 2013. V. 341. № 6146. P. 651–654.
66. Luo M., Chen Y. // *Int. J. Ophthalmol.* 2018. V. 11. № 1. P. 150–159.
67. Kamao H., Mandai M., Ohashi W., Hiramami Y., Kurimoto Y., Kiryu J., Takahashi M. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2017. V. 58. № 1. P. 211–220.
68. Taylor C.J., Peacock S., Chaudhry A.N., Bradley J.A., Bolton E.M. // *Cell Stem Cell*. 2012. V. 3. № 11. P. 147–152.
69. Okita K., Matsumura Y., Sato Y., Okada A., Morizane A., Okamoto S., Hong H., Nakagawa M., Tanabe K., Tezuka K., et al. // *Nat. Methods*. 2011. V. 8. P. 409–412.
70. Ichise H., Nagano S., Maeda T., Miyazaki M., Miyazaki Y., Kojima H., Yawata N., Yawata M., Tanaka H., Saji H., et al. // *Stem Cell Repts.* 2017. V. 9. P. 853–867.