

УДК 577.21:576.364:615-085:576.367

# Потенциал и использование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в генной и клеточной терапии ретинопатий и оптических нейропатий

Е. В. Лапшин\*, Ю. Г. Гершович, А. В. Карабельский

Научный центр трансляционной медицины, Научно-технологический университет «Сириус», Краснодарский край, пгт Сириус, 354340 Россия

\*E-mail: lapshin.ev@talantiuspeh.ru

Поступила в редакцию 08.09.2023

Принята к печати 05.10.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.25454

**РЕФЕРАТ** В представленном обзоре на примере двух наиболее распространенных типов патологии зрительной системы – наследственной оптической нейропатии и ретинопатии – рассмотрены *in vitro* моделирование этих заболеваний с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), а также подходы к разработке терапевтических стратегий. При нейропатиях наблюдаются дегенерация ганглиозных клеток сетчатки и атрофия зрительного нерва, а при ретинопатиях поражаются фоторецепторы или клетки пигментного эпителия сетчатки. ИПСК человека могут служить моделью для изучения патологических основ этих заболеваний и механизмов восстановления зрительных функций. В последние годы достигнут значительный прогресс в создании ганглиозных и ретинальных органоидов из ИПСК, опубликованы данные о потенциале ИПСК для моделирования оптических нейропатий, таких, как глаукома, нейропатия Лебера и др., в том числе и при разработке терапевтических подходов с использованием инструментов генетического редактирования.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, ретинопатии, оптические нейропатии, ганглиозные клетки сетчатки, органоиды, генная терапия, клеточная терапия.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** CRISPR – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами; ГКС – ганглиозные клетки сетчатки; LHON – наследственная оптическая нейропатия Лебера; DOA – аутосомно-доминантная атрофия зрительного нерва; ПР – пигментный ретинит; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ЭРГ – электроретинограмма; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; АФК – активные формы кислорода; HDR – гомологически направленная репарация; NHEJ – негомологичное соединение концов; OCR – скорость потребления кислорода; LCA – врожденный амавроз Лебера.

## ВВЕДЕНИЕ

В 2007 году показали, что зрелые соматические фибробласты можно перепрограммировать в состояние стволовых клеток за счет сверхэкспрессии четырех плюрипотентных транскрипционных факторов (так называемых факторов Яманака) – OCT3/4, SOX2, C-MYC и KLF4 [1]. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) имеют морфологию эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека и экспрессируют их генетические маркеры.

Сверхэкспрессия коктейля транскрипционных факторов позволяет репрограммировать соматические клетки пациента в ИПСК [1–3], которые обладают такими важными характеристиками, как:

- способность дифференцироваться в клетки всех зародышевых листков (эктодерма, мезодерма и энтодерма);

- способность неограниченно размножаться при сохранении нормального кариотипа, что позволяет постоянно получать клеточный материал [4–6].

Развитие методологии работы с ИПСК человека привело к созданию концепции «болезни в чашке» («disease-in-a-dish»). В настоящее время комбинация ИПСК с технологией редактирования генома, анализом регуляции метаболических путей и оценка фенотипа до редактирования и после являются мощным инструментом изучения развития глазных болезней, включая редкие формы наследственных заболеваний

сетчатки глаза, и позволяют разрабатывать способы тестирования эффективности лекарственных препаратов и новых терапевтических подходов.

Генная терапия зачастую является единственным вариантом коррекции наследственных заболеваний. Чаще всего используют заместительную терапию, при которой генетический дефект исправляют путем введения функциональной копии гена в клетки пациента. ИПСК, полученные из первичных клеток пациентов, являются релевантной и удобной моделью как для *in vitro* скрининга и оценки эффективности генотерапевтических препаратов, так и для предсказания потенциальных побочных эффектов терапии и увеличения профиля безопасности продукта.

Для доставки генетического материала используют катионные полимеры, липидные наночастицы и векторные системы на основе различных вирусов. Катионные полимеры способны проникать внутрь клеточного ядра, при этом они могут разрушать клеточные мембраны и оказывать таким образом токсическое действие на клетку [7]. Липидные наночастицы, заключающие ДНК в липосомы, сливаются с клеточной мембраной, высвобождая генетический материал в клетку [8]. К недостаткам доставки с использованием липидных наночастиц ДНК относится низкая эффективность, обусловленная деградацией комплексов липосом с ДНК лизосомами клетки. В качестве векторов чаще всего используют вирусы, обеспечивающие при однократном введении эффективную доставку и экспрессию терапевтического гена, приводящую к длительному ответу на терапию пациентов с тяжелыми генетическими заболеваниями. Разнообразие вирусных векторов дает возможность варьировать специфичность доставки к клеткам [9]. Однако при выборе вирусного вектора следует обязательно учитывать его потенциальную иммуногенность, а также риски инсерционного мутагенеза при использовании интегративных вирусов.

Достижения в области редактирования генома и получения ИПСК открыли новую ветвь генной терапии в сочетании с клеточной терапией. Методика редактирования патогенных генотипов пациента *in vitro* и введения скорректированных ИПСК для коррекции фенотипа лишены минусов классической генной терапии, поскольку обеспечивают иммуносовместимость с реципиентом и позволяют контролировать качество ИПСК до трансплантации [10].

Следует отметить, что основным трендом в использовании ИПСК в генной терапии является разработка способов редактирования с помощью системы CRISPR/Cas9 и ее аналогов, тогда как работы по заместительной генной терапии практически

полностью отсутствуют. Далее будут представлены данные об использовании ИПСК в качестве моделей в основном для оценки эффективности редактирования аутосомно-доминантных мутаций.

В обзоре рассмотрены *in vitro* моделирование двух наиболее распространенных типов патологий зрительной системы – наследственных нейропатий и ретинопатий, и разработка терапевтических стратегий с использованием ИПСК. Обсуждаются также трансляционные достижения клеточной и генной терапии.

### ГЕННАЯ И КЛЕТочНАЯ ТЕРАПИЯ НЕЙРОПАТИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИПСК

Оптические нейропатии, обусловленные гибелью ганглиозных клеток сетчатки и дегенерацией аксонов зрительного нерва, являются основной причиной потери зрения и слепоты во всем мире [11, 12]. Ганглиозные клетки сетчатки (ГКС) – это специализированные нейроны, аксоны которых образуют зрительный нерв, проводящий информацию от глаза к мозгу [13]. Глаукома – прогрессирующая оптическая нейропатия, характеризующаяся структурными изменениями диска (головки) зрительного нерва и необратимой потерей зрения, – наиболее распространенная патология, диагностированная более чем у 60 млн человек [14–19]. Другие оптические нейропатии, такие, как наследственная нейропатия Лебера (LHON) и аутосомно-доминантная атрофия зрительного нерва (DOA), проявляются в более раннем возрасте и вызываются мутациями в митохондриальных генах.

#### Генная терапия нейропатий

LHON – характеризуется потерей центрального зрения и встречается преимущественно у мужчин. Большая часть мутаций при этом заболевании найдена в митохондриальных генах, кодирующих белки первого комплекса электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), *MT-ND4* (m.11778G>A), *MT-ND1* (m.3460G>A), *MT-ND6* (m.14484T>C). Патогенез LHON связан со сниженной генерацией АТФ и накоплением активных форм кислорода (АФК), что приводит к гибели ГКС, атрофии зрительного нерва и, соответственно, к потере центрального зрения сначала в одном глазу, а далее во втором.

Исследователями из Австралии были получены ИПСК от пациента с гомоплазматическими двойными мутациями мтДНК (m.4160T>C и m.14484T>C), приходящиеся на гены *MT-ND1* и *MT-ND6* соответственно. Такой генотип приводит к так называемой «LHON plus», при которой дополнительно развиваются неврологические симптомы, отличные от оптической нейропатии, например, двигательные

расстройства. С помощью гибридной технологии митохондрии в этих ИПСК заменили на митохондрии без мутаций. Уровни апоптоза и АФК в ГКС, полученных из отредактированных ИПСК, были ниже, чем в контрольных ГКС, содержащих мутации [20].

DOA – заболевание, вызываемое митохондриальной дисфункцией, проявляется снижением остроты зрения в раннем возрасте и далее слепотой. При DOA наблюдается повреждение ГКС и их аксонов, образующих зрительный нерв. В основном мутации, приводящие к DOA, локализованы в гене *OPA1*, кодирующем белок внутренней мембраны митохондрий, дисфункция которого влияет на слияние митохондрий, продукцию АТФ, сигналинг апоптотических факторов, метаболизм кальция и поддержание целостности митохондриального генома [21].

В ИПСК, полученных от пациента с мутацией 1334G>A (R445H) в *OPA1*, проведена коррекция мутации с помощью комбинации технологии CRISPR/Cas9 и механизма гомологичной рекомбинации (HDR), где в качестве матрицы использовали ssDNA. Скорость потребления кислорода (OCR) в отредактированных ИПСК была выше, чем в клетках с мутациями, которые характеризовались снижением митохондриальной фрагментации, а также более низкой продукцией апоптотических сигналов [21].

### Клеточная терапия нейропатий

Заместительная клеточная терапия с использованием ИПСК является привлекательным подходом к лечению нейропатий и ретинопатий, особенно на более поздних стадиях патологического процесса, когда произошла значительная потеря клеток. Также считается, что в некоторых случаях трофические факторы, высвобождаемые стволовыми клетками, могут способствовать процессу регенерации при трансплантации. На животных моделях оптической нейропатии была доказана эффективность клеточной терапии на основе ИПСК [22, 23]. Ганглиозные клетки, происходящие из ИПСК, могут интегрироваться и выживать после трансплантации в сетчатку мышей, служащих моделью заболевания [22]. Более того, трансплантация клеток-предшественников, полученных из ИПСК, способствовала заживлению повреждения зрительного нерва у крыс со значительным восстановлением вызванных потенциалов [23].

Следует отметить, что клеточная терапия нейропатий зрительного нерва может использоваться для получения клеток, отличных от ганглиозных. Так, Abu-Hassan D.W. и соавт. показали, что трансплантация клеток трабекулярной сети, полученных из ИПСК, может восстанавливать гомеостатическую

функцию в *ex vivo* перфузированной модели органной культуры переднего сегмента глаза человека [24], открывая тем самым новый интересный подход к лечению глаукомы.

В настоящее время отсутствуют сообщения о проведении клинических испытаний клеточной терапии при нейропатии зрительного нерва, однако проводятся клинические испытания по замещению клеток пигментного эпителия сетчатки, полученных из ИПСК [25, 26]. Недавно компания Advanced Cell Technology, специализирующаяся на стволовых клетках, сообщила об успешном завершении фазы I/IIa клинических испытаний суспензии клеток пигментного эпителия сетчатки, полученных из ЭСК, трансплантированных при связанной с возрастом макулярной дегенерации и болезни Штаргардта [25, 26]. Сообщалось об улучшении зрения без серьезных побочных эффектов или иммунных реакций после трансплантации низкой дозы дифференцированных из ЭСК клеток в один глаз у 18 пациентов. Не получено данных об отторжении трансплантированных клеток, неконтролируемой пролиферации или серьезных глазных или системных проблемах. Отмечено улучшение зрительных функций у большей части пациентов, а испытания достигли целевых конечных точек по безопасности. Кроме того, команда под руководством профессора Масайо Такахаши из Японии готовится к проведению клинических испытаний с использованием ретинального эпителия, полученного из ИПСК, для лечения связанной с возрастом макулярной дегенерации [26]. Эти клинические испытания подтвердят концептуальную возможность использования плюрипотентных стволовых клеток для восстановления функциональности пораженных тканей, предоставив новый альтернативный вариант эффективного и безопасного лечения слепоты, вызванной различными патологическими процессами.

### ГЕННАЯ И КЛЕТочНАЯ ТЕРАПИЯ РЕТИНОПАТИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИПСК

Наследственной ретинопатией считается любое генетическое заболевание, приводящее к поражению сетчатки глаза и, как следствие, к ухудшению зрения. Распространенность этой группы заболеваний составляет около 3 человек из 100. Наиболее частыми симптомами ретинопатий являются изменение полей зрения, неспособность адаптироваться к плохому освещению, искажение форм, размеров объектов и изменение цветовосприятия. Данные о молекулярных процессах заболеваний получены в основном на моделях фибробластов, так как получить образцы сетчатки не представляется возможным. Использование с этой целью ИПСК может

позволить получить более релевантную модель заболевания.

По своему типу различают ретинопатии макулярные и периферические. При макулярных ретинопатиях (например, болезнь Штаргардта и Беста) поражается центральная часть сетчатки – макула. При периферических ретинопатиях нарушается периферическое зрение. К наиболее распространенным заболеваниям этой группы относятся пигментный ретинит и хороидеремия [27].

Самыми тяжелыми и ранними формами наследственных заболеваний сетчатки считаются различные типы врожденного амавроза Лебера (LCA), приводящего к потере зрения при рождении или вскоре после него. При этом заболевании возможно также развитие повышенной светочувствительности, непроизвольное движение глаз (нистагм) и дальность зрения. В редких случаях наблюдается задержка умственного развития.

#### **Применение генотерапевтических подходов к лечению наследственных ретинопатий**

Существует не менее 20 типов LCA, обусловленных разными мутациями в разных генах, а также фенотипическими проявлениями. К наиболее распространенным патологическим мутациям при LCA относятся мутации в генах *CEP290*, *CRB1*, *GUCY2D*, *RPE65*. При этом примерно в 30% случаев молекулярно-генетические причины LCA не найдены [28]. Так белок, кодируемый геном *CEP290*, участвует в клеточном делении, сборке микротрубочек, формировании centrosом и ресничек. Мутации в этом гене приводят к наиболее тяжелой форме LCA – LCA типа 10 [29]. До 15% всех мутаций *CEP290* представлены мутацией IVS26 – 2991+1655 A>G в интроне 26, приводящей к включению экзона со стоп-кодонам (C998X). Получаемый в случае этой мутации укороченный пептид обеспечивает лишь частичную активность CEP290. Модель ИПСК, полученная от пациента с таким генотипом, была отредактирована с помощью CRISPR/Cas9. По сравнению с мутациями в кодирующей части гена, где требуется использование матрицы для рекомбинации, мутации сайта сплайсинга можно скорректировать специфической делецией. Так, редактирование ИПСК с удалением сайта сплайсинга в области IVS26 привело к повышенной продукции функционального CEP290 [29].

Генная терапия с использованием некодирующей РНК, нацеленной на IVS26, оказалась эффективной в модели 3D-органоида сетчатки, полученной из ИПСК пациента. Полностью фосфорилированный и 2'-О-метил-модифицированный РНК-олигонуклеотид (QR-110) корректировал де-

фект сплайсинга CEP290 и восстанавливал дикий тип мРНК. Показано дозозависимое восстановление ресничек фоторецепторов [30].

LCA типа 4, обусловленный мутациями в гене *AIPL1*, характеризуется тяжелым нарушением зрения в младенчестве и прогрессирующей атрофией фоторецепторных клеток. С помощью CRISPR/Cas9 и HDR с эффективностью 30% был отредактирован органоид сетчатки, полученный от ИПСК пациента с мутацией 834 G>A (Trp278X) гена *AIPL1*. Показано восстановление экспрессии *AIPL1*, повышение количества cGMP и PDE6 в клетках после редактирования [31].

LCA типа 7, составляющий около 2% всех LCA, характеризуется ранней дисфункцией фоторецепторов, вызванной мутациями в гене *CRX* (кодирует гомеобоксо-содержащий белок колбочек-палочек). Опосредованное NHEJ (негомологичное соединение концов) CRISPR/Cas9-редактирование мутации 263A>C (K88Q) в гене *CRX* в модели органоидов сетчатки способствовало развитию и созреванию фоторецепторных клеток. Интересно, что стратегия редактирования предполагала внесение двух двухцепочечных разрывов. Один был нацелен на мутацию, а другой – на аллель-специфические SNP между экзонами 2 и 4 гена *CRX* [32].

Пигментный ретинит (ПР) – затрагивающее сетчатку глаза наследственное заболевание с прогрессирующей потерей фоторецепторных клеток. Пациенты ощущают проблемы с ночным и периферическим зрением, хотя полная слепота достаточно редка. Манифестация начинается, как правило, в детском возрасте. Одной из возможных причин ПР является мутация в гене родопсина (*RHO*) [33]. Родопсин – зрительный пигмент, содержащийся в палочках сетчатки, является трансмембранным рецептором, связанным с G-белками, конформация которого изменяется при поглощении квантов света. Родопсин активирует G-белок трансдуцин, активирующий cGMP-зависимую фосфодиэстеразу, что в дальнейшем приводит к изменению проницаемости cGMP-зависимых ионных каналов, гиперполяризации мембраны и возникновению нервного импульса [34]. Используя зависимый от вируса-помощника аденовирусный вектор (HAdV), осуществляли редактирование мутации в ИПСК пациента с мутацией, ведущей к замене E181K в молекуле родопсина. Дифференцированные в фоторецепторные клетки ИПСК после редактирования характеризовались сниженным уровнем аутофагии за счет подавления апоптоза, вызванного стрессом ЭПР. Перенос генов HAdV осуществляли путем гомологичной рекомбинации без внесения разрывов в ДНК [34].

Удалось также отредактировать с помощью CRISPR/Cas9 мутацию 68C>A (P23H) в этом же гене на модели ИПСК. В клетках дикого типа (контрольных) не наблюдали неспецифического редактирования, в то время как в мутантных клетках в результате редактирования происходили сдвиг рамки считывания и терминация (трансляции), что приводило к инактивации мутантного аллеля [29].

Пигментный ретинит, сцепленный с X-хромосомой, встречается у мужчин с частотой 1 на 15 000 человек и проявляется потерей ночного зрения, а затем периферического зрения и полной слепотой к 40 годам. Мутации в этом случае локализуются в гене *RPGR*, кодирующем регулятор GTP-азы пигментного ретинита, влияющим на развитие фоторецепторных клеток, так как является компонентом взаимодействия centrosомы и ресничек. Около 16% случаев ПР связаны с мутациями в *RPGR*. С помощью CRISPR/Cas9 и HDR проведено редактирование ИПСК пациента с мутацией 3070 G>T в гене *RPGR*, где одноцепочечная матрица не имела мутации. Несмотря на то, что этот ген является GC-богатым и содержит нуклеотидные повторы, эффективность редактирования составила 13% [35]. Известны случаи делеции в экзоне 14 гена *RPGR*, приводящие к сдвигу рамки считывания и потере последовательностей, кодируемых экзонами 15–19. Такие мутации приводят к нарушению цилиогенеза, поэтому реснички фоторецепторных клеток у пациентов с таким дефектом укорочены. ИПСК, полученные от пациентов с вариантами мутаций *RPGR* (1685\_1686delAT, 2234\_2235delGA и 2403\_2404delAG), были отредактированы с помощью CRISPR/Cas9 с использованием HDR. Полученные 3D-органоиды сетчатки имели нормальную морфологию, экспрессировали реCOVERIN, содержали большее количество палочек и колбочек по сравнению с контролем [36].

Другим X-сцепленным заболеванием является X-сцепленный ювенильный ретиношизис, который характеризуется дегенеративной нейропатией и отслоением сетчатки. Ювенильный ретиношизис развивается преимущественно у мужчин, а его частота составляет примерно 1:10000. Это заболевание обусловлено мутациями в гене *RS1*, вовлеченном в клеточную организацию сетчатки и межклеточную адгезию. Получены модели ИПСК от пациентов с мутациями 625C>T (R209C) и 488G>A (W163X). Отредактированные с помощью CRISPR/Cas9 и HDR ИПСК показали 50% эффективность редактирования, но также и наличие инсерций. Эффективность опосредованного Cas9-ABE7.10 редактирования оснований в случае

625C>T оказалась сравнимой с подходом, использующим принцип HDR [37].

Мутации в генах *PRPF*, приводящие к ПР типа 13, являются аутосомно-доминантными и объединяют около 15% случаев пигментного ретинита. Белок, кодируемый *PRPF8*, играет важную роль в сплайсинге пре-мРНК, он является основным компонентом сплайсосомы типа U2 и U12 и отвечает за размещение сплайсосомы на пре-мРНК. С помощью CRISPR/Cas9-Gem (эндонуклеаза Cas9 и белок геминин) проведено редактирование ИПСК с мутацией 6901 C>T (P2301S) в гене *PRPF8* за счет HDR. В отредактированных ИПСК, дифференцированных в эпителиальные клетки сетчатки, восстановились морфология и апикально-базальная полярность, способность фагоцитировать внешние сегменты фоторецепторов. Cas9-Gem использовали для деградации системы в фазе G0/G1 для снижения вероятности инсерций, вызванных NHEJ [38].

С помощью системы CRISPR/Cas9 и HDR проведено редактирование ИПСК пациента с мутацией 1115\_1125del11 в гене *PRPF31*, кодирующем компонент сплайсосомного комплекса пре-мРНК (11-й тип пигментного ретинита). Такое редактирование привело к восстановлению молекулярных и клеточных фенотипов индуцированных органоидов сетчатки [39].

Ген *MERTK*, мутации в котором приводят к аутосомно-рецессивному пигментному ретиниту, кодирует рецепторную тирозинкиназу, передающую сигналы из внеклеточного матрикса в цитоплазму. Этот фермент участвует в процессах дифференцировки, выживания клеток и фагоцитозе апоптотических клеток. Мутация 992\_993delCA в гене *MERTK* была скорректирована в ИПСК, полученных от пациента, системой CRISPR/Cas9 и HDR. Дифференцированные в пигментные клетки сетчатки отредактированные ИПСК восстановили экспрессию *MERTK* и функции фагоцитов по сравнению с мутантными вариантами [40, 41].

Основной причиной рецессивного пигментного ретинита у этнических евреев является инсерция Alu длиной 354 п.н. в гене *MAK*, кодирующем серин/треониновую протеинкиназу, участвующую в регуляции клеточного цикла и важную для регуляции длины ресничек и выживания фоторецепторных клеток. Опосредованное CRISPR/Cas9 редактирование с HDR ИПСК с инсерцией Alu привело к восстановлению транскрипта *MAK* [29].

Синдром усиленного ответа S-колбочек опосредован мутацией гена *NR2E3*, кодирующего транскрипционный фактор, активатор развития палочек и репрессор развития колбочек. Для этого синдрома характерна атрофия сетчатки с последующей поте-

рей зрения. S-колбочки – один из трех типов колбочек сетчатки, наименее распространенный в нормальной сетчатке человека. Мутации в гене *NR2E3* приводят к дефектам дифференцировки с образованием большого количества S-колбочек и отсутствию палочек. Нокаут мутантного аллеля в ИПСК пациента с мутацией 166G>A (G56R) в гене *NR2E3*, проведенный с помощью CRISPR/Cas9 и NHEJ, привел к нормальному функционированию и развитию фоторецепторов палочек в дифференцированных органоидах сетчатки [42].

Синдром Ашера – заболевание, на поздних стадиях которого наблюдается потеря зрения (в результате пигментного ретинита), а ранее – потеря слуха, возможны также нарушения вестибулярного аппарата. Одной из причин заболевания является мутация гена *MYO7A*, который кодирует миозин – моторный белок сетчатки, участвующий в обновлении наружных дисков фоторецепторов, способствующий распределению и миграции меланосом и фагосом пигментного эпителия сетчатки, а также связанный с регуляцией транспорта опсина в фоторецепторах сетчатки. Полученные от пациента с мутациями *MYO7A* (с.1184 G>A и с.4118C>T) ИПСК были отредактированы с помощью CRISPR/Cas9 и HDR. После чего наблюдали морфологическое (в виде слипания стереоцилии) и функциональное (в виде восстановления мембранного потенциала) восстановление дифференцированных отредактированных волосковых клеток [43]. Также синдром Ашера ассоциирован с мутациями в гене *USH2A*, кодирующим белок ушерин, который участвует в процессах звуко- и световосприятия в комплексе USH2. В фоторецепторах сетчатки комплекс USH2 поддерживает комплекс перилимбальной мембраны, который играет роль в регуляции внутриклеточного транспорта белков. В ИПСК пациентов использовали CRISPR-eSpCas9 и HDR для исправления мутаций 2276G>T (C759F) и 2299delG (E767Serfs\*21), расположенных на расстоянии 22 п.н. друг от друга в экзоне 13 гена *USH2A*. Достигнута 15% эффективность редактирования и восстановление экспрессии *USH2A*, кроме того, ИПСК сохранили геномную стабильность и плюрипотентность [44, 45].

### Клеточная терапия ретинопатий

На животных моделях ретинопатий доказана эффективность клеточной терапии на основе ИПСК. Так, сетчатку, полученную из ИПСК человека, трансплантировали в субретинальное пространство обезьян с лазер-индуцированным повреждением сетчатки и иммунодефицитным крысам с пигментным ретинитом. Трансплантированные клетки интегрировались в сетчатку крысы и образовыва-

ли синаптические связи с биполярными клетками хозяина. В модели обезьян трансплантированные клетки интегрировались в сетчатку хозяина; зафиксировано и улучшение электроретинограммы (ЭРГ) [46]. Аналогично, в модели пигментного ретинита у мышей субретинальная трансплантация ретинальных сфероидов, полученных из ИПСК, задерживала истончение сетчатки, увеличивала уровень фактора, производного пигментного эпителия (PEDF), уменьшала количество апоптотических клеток, а также уменьшала инфильтрацию микроглии в сетчатку [47]. У крыс с наследственной мутацией гена протоонкогенной тирозинкиназы *MER* (*MERTK*) как модели дегенерации сетчатки субретинальная трансплантация клеток РПЭ, полученных из ИПСК, значительно восстанавливала зрительную функцию, измеренную порогами оптокинетического отслеживания. Ни у одного животного не было выявлено аномальной пролиферации или образования тератом [48]. Интересно, что совместная трансплантация различных типов ретинальных клеток, полученных из ИПСК, показывала лучшие результаты по сравнению с трансплантацией отдельных типов клеток, это приводило к лучшему зрительному ответу и сохранению внешнего нуклеарного слоя в модели дегенерации сетчатки у крыс [49]. В животной модели пигментного ретинита субретинально трансплантированные предшественники фоторецепторов, экспрессирующие *CRX*, происходящие из ИПСК, встраивались во внутренний ядерный слой клеток. Пересаженные клетки экспрессировали маркер аррестин 3, что указывало на их дальнейшее созревание [50].

В доклиническом исследовании на крысах и свиньях ИПСК, полученные из клеток CD34+ пациентов с макулярной дистрофией сетчатки, при дифференцировке в клетки ретины интегрировались и восстанавливали сетчатку. В этом исследовании обнаружено, что для достижения терапевтического эффекта при пересадке монослоя требовалось в 10 раз меньше клеток, чем при использовании суспензии клеток. При этом клетки ретины, трансплантированные в виде суспензии, не смогли интегрироваться в слой ретинальных клеток крысы, каркас на основе поли(молочно-когличевой кислоты) (PLGA) способствовал интеграции трансплантированного слоя клеток в мембрану Бруха крысы [51].

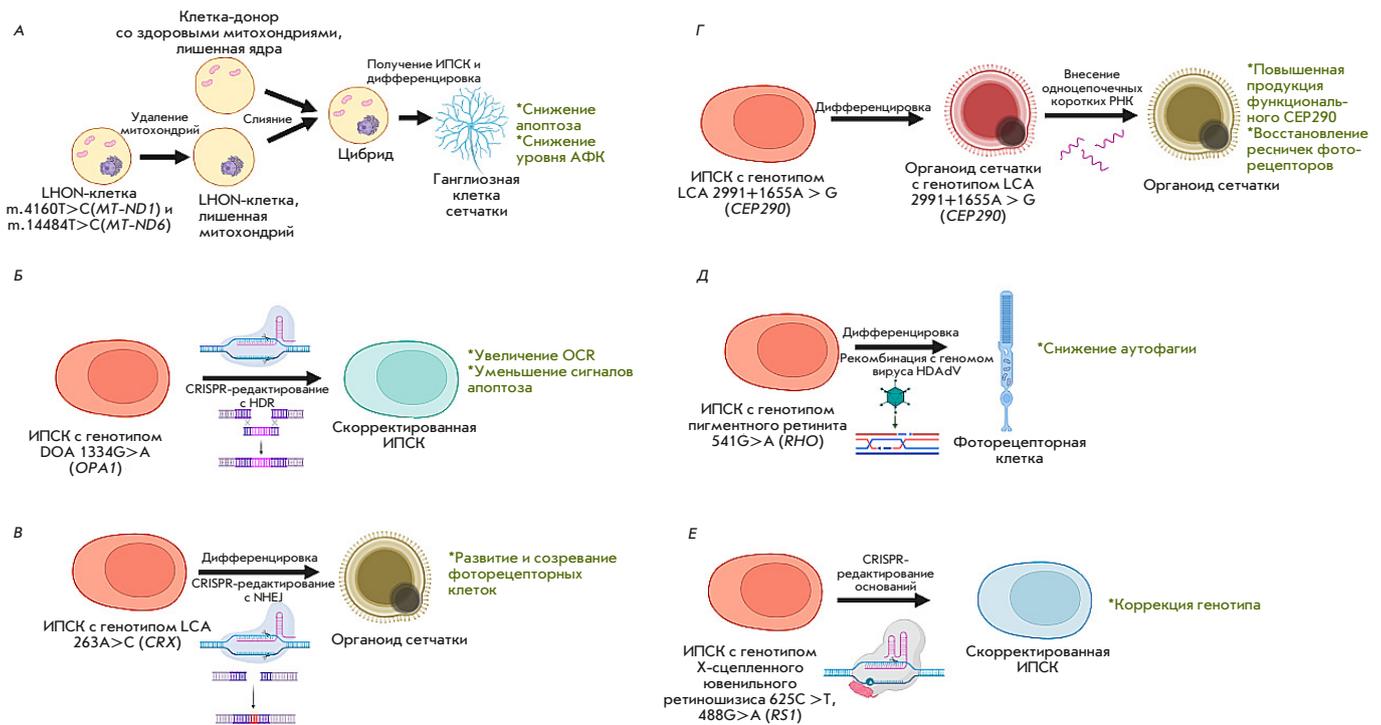
### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хотя использование ИПСК в исследованиях оптических нейропатий и ретинопатий является относительно новым подходом, нет сомнений в том, что эта технология обладает высоким потенциалом как с точки зрения изучения патогенеза заболева-

Таблица 1. Изучение потенциала генотерапевтических подходов и генетического редактирования наследственных ретинопатий и оптических нейропатий на моделях ИПСК

Заболевание	Мутация	Тип наследования	Подход к лечению	Основные эффекты/результат
LHON* <sup>1</sup>	m.4160T>C(MT-ND1) и m.14484T>C(MT-ND6)	Материнское, митохондриальное	Замена митохондрий, создание цбридов	Снижение апоптотических эффектов и уровня АФК* <sup>2</sup> в дифференцированных ГКС* <sup>3</sup> [20]
DOA* <sup>4</sup>	1334G>A (OPA1)	Аутосомно-доминантный	CRISPR-редактирование с HDR* <sup>5</sup>	Увеличение OCR* <sup>6</sup> в отредактированных ИПСК* <sup>7</sup> и уменьшение сигналов апоптоза [21]
LCA* <sup>8</sup>	2991+1655A > G (CEP290)	Аутосомно-рецессивный	CRISPR-редактирование с NHEJ* <sup>9</sup> , РНК-интерференция	Повышенная продукция функционального CEP290. Восстановление ресничек фоторецепторов [29, 30]
	834G>A (AIPL1)	Аутосомно-рецессивный	CRISPR-редактирование с HDR	Восстановление экспрессии AIPL1, повышение количества cGMP* <sup>10</sup> и PDE6 в клетках органоида сетчатки [31]
	263A>C (CRX)	Аутосомно-рецессивный	CRISPR-редактирование с NHEJ	В модели органоидов сетчатки, полученных от ИПСК пациентов, способствовало развитию и созреванию фоторецепторных клеток [32]
Пигментный ретинит	541 G>A (RHO)	Аутосомно-доминантный	Рекомбинация с геномом HDAdV	Дифференцированные в фоторецепторные клетки ИПСК после редактирования проявили сниженную аутофагию [34]
	68C>A (RHO)	Аутосомно-доминантный	CRISPR-редактирование с NHEJ	Инактивация мутантного аллеля [29]
	3070G>T (RPGR)	X-сцепленный	CRISPR-редактирование с HDR	Восстановление нуклеотидной последовательности [35]
	1685_1686delAT, 2234_2235delGA и 2403_2404delAG (RPGR)	X-сцепленный	CRISPR-редактирование с HDR	Органоиды сетчатки демонстрировали нормальную морфологию [36]
	6901C>T (PRFP8)	Аутосомно-доминантный	CRISPR-редактирование с HDR	Морфология, способность фагоцитировать были восстановлены в дифференцированных, отредактированных ИПСК в эпителиальные клетки сетчатки [38]
	1115_1125del11 (PRPF31)	Аутосомно-доминантный	CRISPR-редактирование с HDR	Восстановление молекулярных и клеточных фенотипов в индуцированных органоидах сетчатки [39]
	992_993delCA (MERTK)	Аутосомно-рецессивный	CRISPR-редактирование с HDR	Восстановление экспрессии MERTK и функции фагоцитов [40, 41]
	Инсерция Alu длиной 354 п.н. (MAK)	Аутосомно-рецессивный	CRISPR-редактирование с HDR	Восстановление транскрипта MAK [29]
X-сцепленный ювенильный ретиношизис	625C >T, 488G>A (RS1)	X-сцепленный	CRISPR-редактирование оснований при помощи ABE7.10	Восстановление нуклеотидной последовательности [37]
Синдром усиленного ответа S-колбочек	166G>A (NR2E3)	Аутосомно-рецессивный	CRISPR-редактирование с NHEJ	Нормальное функционирование и развитие фоторецепторов палочек в дифференцированных органоидах сетчатки [42]
Синдром Ашера	c.1184G>A и c.4118C>T (MYO7A)	Аутосомно-рецессивный	CRISPR-редактирование с HDR	Морфологическое (в виде слияния стереоцилии) и функциональное восстановление (в виде восстановления мембранного потенциала) [43]
	2276G>T (USH2A)	Аутосомно-рецессивный	CRISPR-редактирование с HDR	Восстановление нуклеотидной последовательности [44, 45]

\*<sup>1</sup> – наследственная оптическая нейропатия Лебера; \*<sup>2</sup> – активные формы кислорода; \*<sup>3</sup> – ганглиозные клетки сетчатки; \*<sup>4</sup> – аутосомно-доминантная атрофия зрительного нерва; \*<sup>5</sup> – гомологически направленная репарация; \*<sup>6</sup> – скорость потребления кислорода; \*<sup>7</sup> – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; \*<sup>8</sup> – врожденный амавроз Лебера; \*<sup>9</sup> – негомологичное соединение концов; \*<sup>10</sup> – циклический гуанозинмонофосфат.



**Рис. 1.** Подходы к генной терапии наследственных ретинопатий/нейропатий на моделях ИПСК. А – замена митохондрий, создание цибридов на модели LHON. Б – CRISPR-редактирование с HDR на модели DOA. В – CRISPR-редактирование NHEJ на модели LCA. Г – РНК-интерференция на модели LCA. Д – рекомбинация с геномом вируса HDAdV на модели пигментного ретинита. Е – CRISPR-редактирование оснований при помощи ABE7.10 на модели X-сцепленного ювенильного ретиношиза

ний, так и с точки зрения апробации и оптимизации методов генной терапии и генетического редактирования (рис. 1, табл. 1). Моделирование заболеваний с использованием ИПСК позволяет изучать основные механизмы, ведущие к потере ганглиозных или ретинальных клеток, а заместительная клеточная терапия с использованием ИПСК, полученных из собственных соматических клеток пациента, имеет минимальный риск иммунного отторжения после трансплантации и уже демонстрирует высокую эффективность на различных моделях. Генная терапия в сочетании с заместительной клеточной терапией может быть использована для коррекции генетических дефектов в клетках, полученных из ИПСК, перед трансплантацией.

ИПСК обладают огромным трансляционным потенциалом в широком спектре терапевтических областей, а отработка и совершенствование протоколов для повышения эффективности и чистоты полученных из ИПСК ганглиозных и ретинальных клеток будут иметь решающее значение для создания стандартизированной методологии использования ИПСК в моделировании заболеваний, скрининге лекарств, токсикологических исследованиях, клеточной и генной терапии, регенеративной медицине. ●

*Финансирование проекта осуществлялось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-10-2021-093; Проект GTH-RND-2112).*

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. // Cell. 2007. V. 131. № 5. P. 861–872.
2. Piao Y., Hung S.S., Lim S.Y., Wong R.C., Ko M.S. // Stem Cells Transl. Med. 2014. V. 3. № 7. P. 787–791.
3. Hung S.S., Pebay A., Wong R.C. // J. Vis. Exp. 2015. V. 102. P. e53174.
4. Evans M.J., Kaufman M.H. // Nature. 1981. V. 292. № 5819. P. 154–156.
5. Martin G.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 12. P. 7634–7638.
6. 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.
7. Giacca M., Zacchigna S. // J. Control. Release. 2012. V. 161. № 2. P. 377–388.
8. Junquera E., Aicart E. // Curr. Top. Med. Chem. 2014. V. 14. № 5. P. 649–663.

9. Eggermann K., Gess B., Häusler M., Weis J., Hahn A., Kurth I. // *Dtsch. Arztebl. Int.* 2018. V. 115. № 6. P. 91–97.
10. Paolini Sguazzi G., Muto V., Tartaglia M., Bertini E., Compagnucci C. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 24. P. 13674.
11. Ghaffarieh A., Levin L.A. // *Int. Rev. Neurobiol.* 2012. V. 105. P. 1–17.
12. Moore D.L., Goldberg J.L. // *J. Neuroophthalmol.* 2010. V. 30. № 4. P. 347–360.
13. Yu D.Y., Cringle S.J., Balaratnasingam C., Morgan W.H., Yu P.K., Su E.N. // *Progr. Retinal Eye Res.* 2013. V. 36. P. 217–246.
14. Cook C., Foster P. // *Can. J. Ophthalmol.* 2012. V. 47. № 3. P. 223–226.
15. Quigley H.A., Broman A.T. // *Br. J. Ophthalmol.* 2006. V. 90. № 3. P. 262–267.
16. Tham Y.C., Li X., Wong T.Y., Quigley H.A., Aung T., Cheng C.Y. // *Ophthalmology.* 2014. V. 121. № 11. P. 2081–2090.
17. Garcia-Valenzuela E., Gorczyca W., Darzynkiewicz Z., Sharma S.C. // *J. Neurobiol.* 1994. V. 25. № 4. P. 431–438.
18. Kerrigan L.A., Zack D.J., Quigley H.A., Smith S.D., Pease M.E. // *Arch. Ophthalmol.* 1997. V. 115. № 8. P. 1031–1035.
19. Quigley H.A., Addicks E.M., Green W.R., Maumenee A.E. // *Arch. Ophthalmol.* 1981. V. 99. № 4. P. 635–649.
20. Wong R.C.B., Lim S.Y., Hung S.S.C., Jackson S., Khan S., van Bergen N.J., De Smit E., Liang H.H., Kearns L.S., Clarke L., et al // *AGING-US.* 2017. V. 9. № 4. P. 1341–1350.
21. Sladen P.E., Perdigo P.R.L., Salisbury G., Novoselova T., van der Spuy J., Chapple J.P., Yu-Wai-Man P., Cheetham M.E. // *Mol. Ther. Nucl. Acids.* 2021. V. 26. P. 432–443.
22. Hambright D., Park K.Y., Brooks M., McKay R., Swaroop A., Nasonkin I.O. // *Mol. Vis.* 2012. V. 18. P. 920–936.
23. Satarian L., Javan M., Kiani S., Hajikaram M., Mirnajafi-Zadeh J., Baharvand H. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 8. P. e71855.
24. Abu-Hassan D.W., Li X., Ryan E.I., Acott T.S., Kelley M.J. // *Stem Cells.* 2015. V. 33. № 3. P. 751–761.
25. 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.
26. 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.
27. Hereditary retinal dystrophy. URL: <https://www.barraquer.com/en/pathology/hereditary-retinal-dystrophy>.
28. Leber congenital amaurosis. URL: <https://medlineplus.gov/genetics/condition/leber-congenital-amaurosis>.
29. Burnight E.R., Giacalone J.C., Cooke J.A., Thompson J.R., Bohrer L.R., Chirco K.R., Drack A.V., Fingert J.H., Worthington K.S., Wiley L.A., et al. // *Mol. Ther.* 2017. V. 25. № 9. P. 1999–2013.
30. Dulla K., Aguila M., Lane A., Jovanovic K., Parfitt D.A., Schulkens I., Chan H.L., Schmidt I., Beumer W., Vorthoren L., et al. // *Mol. Ther. Nucl. Acids.* 2018. V. 12. P. 730–740.
31. Leung A., Sacristan-Reviriego A., Perdigo P.R.L., Sai H., Georgiou M., Kalitzeos A., Carr A.F., Coffey P.J., Michaelides M., Bainbridge J., et al. // *Stem Cell Repts.* 2022. V. 17. № 10. P. 2187–2202.
32. Chirco K.R., Chew S., Moore A.T., Duncan J.L., Lamba D.A. // *Stem Cell Repts.* 2021. V. 16. № 11. P. 2690–2702.
33. Rezaie T., Child A., Hitchings R., Brice G., Miller L., Coca-Prados M., Héon E., Krupin T., Ritch R., Kreutzer D., et al. // *Science.* 2002. V. 295. № 5557. P. 1077–1079.
34. Yoshida T., Ozawa Y., Suzuki K., Yuki K., Ohyama M., Akamatsu W., Matsuzaki Y., Shimmura S., Mitani K., Tsubota K., et al. // *Mol. Brain.* 2014. V. 7. P. 45.
35. Bassuk A.G., Zheng A., Li Y., Tsang S.H., Mahajan V.B. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 19969.
36. Deng W.L., Gao M.L., Lei X.L., Lv J.N., Zhao H., He K.W., Xia X.X., Li L.Y., Chen Y.C., Li Y.P., et al. // *Stem Cell Repts.* 2018. V. 10. № 4. P. 1267–1281.
37. Huang K.C., Wang M.L., Chen S.J., Kuo J.C., Wang W.J., Nhi Nguyen P.N., Wahlin K.J., Lu J.F., Tran A.A., Shi M., et al. // *Stem Cell Repts.* 2019. V. 13. № 5. P. 906–923.
38. Foltz L.P., Howden S.E., Thomson J.A., Clegg D.O. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 12. P. 4127.
39. Buskin A., Zhu L., Chichagova V., Basu B., Mozaffari-Jovin S., Dolan D., Droop A., Collin J., Bronstein R., Mehrotra S., et al. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 4234.
40. Artero-Castro A., Long K., Bassett A., Machuca C., León M., Ávila-Fernandez A., Cortón M., Vidal-Puig T., Ayuso C., Lukovic D., et al. // *Stem Cell Res.* 2019. V. 34. P. 101341.
41. Artero-Castro A., Long K., Bassett A., Ávila-Fernandez A., Cortón M., Vidal-Puig A., Jendelova P., Rodriguez-Jimenez F.J., Clemente E., Ayuso C., et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 4. P. 2092.
42. Diakatou M., Dubois G., Erkilic N., Sanjurjo-Soriano C., Meunier I., Kalatzis V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 5. P. 2607.
43. Tang Z.H., Chen J.R., Zheng J., Shi H.S., Ding J., Qian X.D., Zhang C., Chen J.L., Wang C.C., Li L., et al. // *Stem Cells Transl. Med.* 2016. V. 5. № 5. P. 561–571.
44. Sanjurjo-Soriano C., Erkilic N., Baux D., Mamaeva D., Hamel C.P., Meunier I., Roux A.F., Kalatzis V. // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2019. V. 17. P. 156–173.
45. Liu X., Lillywhite J., Zhu W., Huang Z., Clark A.M., Gosstola N., Maguire C.T., Dykxhoorn D., Chen Z.Y., Yang J. // *Genes (Basel).* 2021. V. 12. № 6. P. 805.
46. Tu H.Y., Watanabe T., Shirai H., Yamasaki S., Kinoshita M., Matsushita K., Hashiguchi T., Onoe H., Matsuyama T., Kuwahara A., et al. // *EBioMedicine.* 2019. V. 39. P. 562–574.
47. Zhu D., Xie M., Gademann F., Cao J., Wang P., Guo Y., Zhang L., Su T., Zhang J., Chen J. // *Stem Cell Res. Ther.* 2020. V. 11. № 1. P. 98.
48. Surendran H., Nandakumar S., Reddy K.V.B., Stoddard J., Mohan K.V., Upadhyay P.K., McGill T.J., Pal R. // *Stem Cell Res. Ther.* 2021. V. 12. № 1. P. 70.
49. Salas A., Duarri A., Fontrodona L., Ramírez D.M., Badia A., Isla-Magrané H., Ferreira-de-Souza B., Zapata M.Á., Raya Á., Veiga A., et al. // *Mol. Ther. Methods Clin. Develop.* 2021. V. 20. P. 688–702.
50. Collin J., Zerti D., Queen R., Santos-Ferreira T., Bauer R., Coxhead J., Hussain R., Steel D., Mellough C., Ader M., et al. // *Stem Cells (Dayton, Ohio).* 2019. V. 37. № 5. P. 609–622.
51. Sharma R., Khristov V., Rising A., Jha B.S., Dejene R., Hotaling N., Li Y., Stoddard J., Stankewicz C., Wan Q., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2019. V. 11. № 475. P. eaat5580.