

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ГЛАЗНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ИМЕНИ ГЕЛЬМГОЛЬЦА» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

БРИЛЛИАНТОВА

АНГЕЛИНА ГРАНТОВНА

**ИММУНОСУПРЕССИВНАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ
РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

3.1.5. Офтальмология

3.2.7. Иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

академик РАН, доктор медицинских наук

Нероев Владимир Владимирович

кандидат биологических наук

Балацкая Наталья Владимировна

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Дегенеративные заболевания сетчатки, связанные с поражением ретинального пигментного эпителия: эпидемиология, патогенез, классификация, клинические особенности	14
1.2 Иммунная привилегия субретинального пространства, возможности заместительной трансплантации РПЭ для лечения дегенерации сетчатки.....	20
1.3 Подходы к профилактике тканевой несовместимости при трансплантации ретинального пигментного эпителия.....	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	39
2.1 Общая характеристика экспериментальных групп.....	39
2.2 Клинико-инструментальные методы обследования экспериментальных животных.....	41
2.3 Моделирование атрофии, трансплантация суспензии ИПСК-РПЭ, схемы комбинированной иммуносупрессивной терапии (КИТ)	43
2.4 Иммунологические методы исследования, оценка токсичности системных иммуносупрессивных препаратов, применяемых в составе КИТ.....	48
2.5 Статистическая обработка результатов исследования.....	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	50
3.1 Оценка изменений системной и локальной продукции медиаторов иммунного ответа и супрессивных цитокинов при атрофии РПЭ в эксперименте	50
3.2 Анализ результатов клинико–инструментальных исследований после трансплантации суспензии ИПСК-РПЭ в группах животных без офтальмопатологии и с моделью атрофии РПЭ в эксперименте при использовании двух схем комбинированной иммуносупрессии.....	55

3.2.1 Анализ клинических результатов трансплантации суспензии ИПСК-РПЭ в здоровый глаз экспериментальных животных с применением разных режимов комбинированной иммуносупрессивной терапии (КИТ).....	57
3.2.2 Анализ результатов трансплантации суспензии ИПСК-РПЭ моделям с атрофией ретинального пигментного эпителия на фоне двух схем КИТ.....	61
3.2.3 Оценка изменений биохимических показателей гепато- и нефротоксичности у животных–реципиентов на фоне двух схем комбинированной иммуносупрессивной терапии	66
3.3 Изучение динамики показателей локальной и системной продукции цитокинов иммунологического гомеостаза после трансплантации ИПСК-РПЭ в группах животных без офтальмопатологии и с моделью атрофии РПЭ на фоне двух схем комбинированной иммуносупрессивной терапии (КИТ) в эксперименте	71
3.3.1 Изучение и сравнительный анализ изменений уровней цитокинов иммунного ответа и факторов супрессии в стекловидном теле и сыворотке крови животных-реципиентов без офтальмопатологии, получавших ЦсА или ММФ в качестве системного компонента КИТ	71
3.3.2 Сравнительный анализ изменений содержания супрессивных факторов и цитокинов иммунного ответа в стекловидном теле и сыворотке крови животных с атрофией ретинального пигментного эпителия при введении ИПСК-РПЭ на фоне двух схем КИТ	81
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	92
ВЫВОДЫ.....	103
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	105
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	106

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – антиген

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АПК – антигенпрезентирующие клетки

АСТ – аспартатаминотрансфераза

АФ – аутофлюоресценция

ВМД – возрастная макулярная дегенерация

ГА – географическая атрофия

ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа

ГРБ – гематоретинальный барьер

ИКК – иммунокомпетентные клетки

ИП – иммунная привилегия

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

ИПСК-РПЭ – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, направленно дифференцированные в ретинальный пигментный эпителий

КИТ – комбинированная иммуносупрессивная терапия

КС – кортикостероиды

ММФ – микофенолата мофетил

ОКТ – оптическая когерентная томография

ПР – пигментный ретинит

РПЭ – ретинальный пигментный эпителий

СК – стволовые клетки

СК – сыворотка крови

СРП – субретинальное пространство

СТ – стекловидное тело

ФА – флюоресцентная ангиография

ХНВ – хориоидальная неоваскуляризация

Цс А – циклоспорин А

ЭАУ – экспериментальный аутоиммунный увеоретинит

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

IL-6 – интерлейкин-6

IL-2 – интерлейкин-2

TGF- β 2 – трансформирующий фактор бетта 2

TGF- β 1 – трансформирующий фактор бетта 1

TSP-1 – тромбоспондин 1

ВВЕДЕНИЕ

Дегенеративное поражение ретинального пигментного эпителия (РПЭ), выполняющего ключевые метаболические и защитные функции в поддержании гомеостаза сетчатки, лежит в основе патогенеза возрастной макулярной дегенерации (ВМД) и наследственных дистрофий сетчатки.

ВМД является одной из главных причин необратимого ухудшения центрального зрения у пожилых людей, имеет тенденцию к распространению в развитых странах [179].

Варианты лечения поздних стадий заболевания ограничены и направлены на борьбу с патологической неоваскуляризацией при «влажной» форме, для «географической» атрофии (ГА) эффективная терапия отсутствует, так как РПЭ не обладает способностью к регенерации [80, 136].

Достижения в области клеточной биологии, совершенствование витреоретинальной хирургии открыли новые горизонты для разработки методов лечения заболеваний сетчатки, связанных с дегенерацией РПЭ.

Заместительная трансплантация стволовыми клетками (эмбриональными (ЭСК), индуцированными плюрипотентными стволовыми (ИПСК), дифференцированными в РПЭ), представляется наиболее многообещающим подходом для замены поврежденного пигментного эпителия и, по данным ряда авторов, способна улучшить зрительные функции у пациентов, страдающих ВМД [51, 52, 39, 132, 143].

ИПСК имеют множество преимуществ: их морфофункциональные свойства эквивалентны ЭСК, они могут самообновляться и дифференцироваться в различные типы клеток взрослого организма, а их использование не вызывает этических вопросов [54, 116].

Важным шагом в этой области стало исследование Y. Li с соавт., где были представлены доказательства, что клетки РПЭ, полученные путем направленной дифференцировки из ИПСК (ИПСК-РПЭ), улучшают показатели электроретинографии при субретинальной трансплантации в модели пигментного ретинита у мышей [112].

Как известно, глаз является иммунопривилегированным органом подобно головному мозгу, волосяным фолликулам и репродуктивной системе [101, 177], что теоретически должно способствовать безопасной трансплантации в субретинальное пространство (СРП) [71, 189].

Уникальные свойства ИПСК-РПЭ: противовоспалительная активность, способность к длительному выживанию в среде реципиента – все это также создает благоприятные условия для проведения заместительной клеточной трансплантации и достижения положительных функциональных результатов [166].

Однако по данным ряда экспериментальных исследований, субретинальное введение чужеродного клеточного материала *in vivo* приводило к его деструкции и развитию воспаления в заднем отделе глаза при отсутствии иммуносупрессии [123, 143, 145, 150].

Для профилактики отторжения донорских клеток РПЭ при их трансплантации в эксперименте наиболее востребованными являются циклоспорин А (ЦсА) и кортикостероидные препараты (КС) – традиционные средства выбора при пересадках роговицы [42, 57, 95].

Группа Stanzel В.В. и соавт., проводила трансплантацию человеческого РПЭ в СРП кроликам на фоне двух режимов введения стероидов: интравитреального и внутримышечного. Авторы продемонстрировали, что лучшая выживаемость донорского материала была у животных с местным введением стероидов и составила 30 дней [160].

Однако длительные курсы терапии кортикостероидными препаратами или их высокие дозировки могут вызвать целый ряд побочных эффектов, таких как появление и прогрессирование катаракты, повышение внутриглазного давления [108].

Применение системной иммуносупрессивной терапии ЦсА при трансплантации человеческого ИПСК-РПЭ кроликам, по сообщению Ilmarinen Т. и соавт., не приводило к приживлению клеточного материала в СРП, несмотря на то, что хирургическое вмешательство осуществляли на

здоровом глазу с интактным РПЭ, который, как известно, продуцирует в норме широкий спектр иммуносупрессивных факторов [99].

При разработке подходов к заместительной клеточной трансплантации важно учитывать, что хроническое вялотекущее воспаление в СРП (например, при ВМД) способствует снижению иммуносупрессивной активности РПЭ и может привести к нарушению иммунной привилегии глаза, активации трансплантационного ответа [17, 25].

Однако до настоящего времени не разработано оптимального метода профилактики отторжения даже при субретинальной трансплантации в здоровый глаз.

В литературе имеется единственная публикация, где описан случай длительного выживания человеческих ИПСК-РПЭ при введении в СРП интактного глаза примата на фоне однократной интравитреальной инъекции триамцинолона (во время трансплантации) и дальнейшего системного (перорального) применения ЦсА [83].

В этой связи применение комбинации местных и системных иммуносупрессивных препаратов, направленных на подавление как внутриглазного воспаления, так и центрального иммунного ответа, развиваемого против трансплантата, может выступить оптимальным решением проблемы тканевой несовместимости при субретинальной трансплантации ИПСК-РПЭ в эксперименте.

Циклоспорин А, активно используемый при пересадках солидных органов, в ревматологии, обладает выраженными гепато- и нефротоксичностью, гипертензивным действием, способствует снижению резистентности организма (повышает риск развития инфекционных заболеваний, возникновения опухолей и пр.) [137, 140].

Вместе с тем накоплены данные, свидетельствующие о возможностях микофенолата мофетила (ММФ) – иммунодепрессанта с менее широким спектром неблагоприятных эффектов. Подтверждение его высокой результативности уже получено в общей трансплантологии (при пересадке

сердца и почек) и в офтальмологии, при кератопластике высокого риска [47, 149, 152].

По данным ряда зарубежных авторов, ММФ обладает антиангиогенным, антипролиферативным эффектами: способен подавлять пролиферацию сосудистого эндотелия и фибробластов, инвазию/миграцию и образование эндотелиальных клеточных трубок *in vitro* [70, 89, 128, 129].

В недавнем исследовании Yang P. с коллегами продемонстрированы ретинопротекторные и антиоксидантные свойства ММФ на моделях мышей с пигментным ретинитом [183].

Вышеперечисленные эффекты ММФ представляют интерес в плане его использования при заместительной клеточной трансплантации ИПСК-РПЭ.

Известно, что в поддержании иммунологического гомеостаза задействовано множество факторов: среди них особо важную роль играют пептидные медиаторы семейства трансформирующего фактора роста (TGF β) и активирующие их молекулы, вырабатываемые как непосредственно в глазу, так и клетками других органов и тканей [131].

Однако целенаправленные исследования иммунорегуляторных цитокинов при трансплантации РПЭ до настоящего времени не проводили.

Цель работы

Клинико-иммунологическое обоснование и разработка оптимальной схемы комбинированной иммуносупрессивной терапии при трансплантации индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, направленно дифференцированных в ретинальный пигментный эпителий (ИПСК-РПЭ), в эксперименте на кроликах.

Задачи исследования

1. Определить содержание медиаторов иммунного ответа (IL-2, IL-6), иммуносупрессивных факторов (TGF- β 1, TSP-1, TGF- β 2) в крови (СК) и материале глаз (стекловидном теле (СТ)) животных без офтальмопатологии и с атрофией ретинального пигментного эпителия до трансплантации ИПСК-РПЭ, осуществить поиск взаимосвязей изменения уровней интраокулярной и

системной продукции исследуемых цитокинов с патологическим процессом в сетчатке.

2. На основании анализа клинико-инструментальных данных представить характеристику течения раннего и отдаленного посттрансплантационного периода у животных–реципиентов ИПСК-РПЭ с применением двух схем комбинированной иммуносупрессивной терапии, включающей в качестве системного компонента селективные иммуносупрессоры циклоспорин А или микофенолата мофетил.

3. Изучить изменения локальной и системной продукции цитокинов иммунологического гомеостаза при введении суспензии ИПСК-РПЭ с применением двух режимов комбинированной иммуносупрессивной терапии.

4. Оценить динамику основных биохимических показателей сыворотки крови, отражающих токсическое действие системных иммуносупрессоров, применяемых в составе КИТ, при трансплантации суспензии ИПСК-РПЭ в эксперименте.

5. Предложить оптимальную схему комбинированной иммуносупрессивной терапии для профилактики тканевой несовместимости при трансплантации ИПСК-РПЭ в эксперименте.

Научная новизна исследования

- Впервые в РФ определены особенности локальной и системной продукции медиаторов иммунологического гомеостаза в экспериментальной модели атрофии РПЭ на кроликах.
- Впервые в РФ проведено сравнительное исследование и представлена характеристика течения постоперационного периода у экспериментальных животных при субретинальной трансплантации ИПСК-РПЭ в здоровый глаз и с атрофией РПЭ в условиях двух схем комбинированной иммуносупрессивной терапии, включающих однократное интравитреальное интраоперационное введение триамцинолона ацетонида в сочетании с последующим ежедневным системным применением циклоспорина А или микофенолата мофетила.
- Впервые в РФ проведено исследование изменения концентраций цитокинов

иммунного ответа (IL-2, IL-6) и факторов супрессии (TGF- β 1, TSP-1, TGF- β 2) в сыворотке крови и стекловидном теле экспериментальных животных при субретинальной трансплантации ИПСК-РПЭ на фоне разных режимов комбинированной иммуносупрессивной терапии.

Практическая значимость

- Впервые в РФ на основании анализа данных собственных исследований представлено научно обоснованное применение комбинированной иммуносупрессивной терапии при проведении субретинальной трансплантации ИПСК-РПЭ в эксперименте.

- Впервые в РФ разработан способ профилактики тканевой несовместимости при субретинальной трансплантации человеческих ИПСК-РПЭ крупным экспериментальным животным, что открывает перспективы для полноценного тестирования свойств потенциальных биомедицинских клеточных продуктов в офтальмологии, в частности, для терапии дегенеративных заболеваний сетчатки, ассоциированных с поражением ретинального пигментного эпителия.

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационного исследования явилось последовательное применение методов научного познания. Работа выполнена с использованием комплекса клинических, инструментальных, иммунологических, аналитических и статистических методов анализа.

Положения, выносимые на защиту

1. Атрофия РПЭ сопровождается ростом интраокулярного уровня IL-2 и снижением концентрации TGF- β 1 в сыворотке крови экспериментальных животных, что указывает на ослабление иммунологической толерантности и необходимость применения комбинации иммуносупрессивных средств (действующих местно и системно) при трансплантации ИПСК-РПЭ.

2. Применение комбинированной иммуносупрессивной терапии, включающей в качестве системной компоненты как циклоспорин А, так и микофенолата мофетил, позволяет предотвратить осложнения, связанные с

развитием интраокулярного воспаления и реакции тканевой несовместимости у животных с моделью атрофии ретинального пигментного эпителия при трансплантации ИПСК-РПЭ в эксперименте.

3. Эффект иммуносупрессии при субретинальном введении ксеногенных ИПСК-РПЭ достигается на фоне обеих схем комбинированной иммуносупрессивной терапии (включающих в качестве системного компонента как циклоспорин А, так и микофенолата мофетил), о чем доказывают результаты сравнительного анализа изменений концентрации медиаторов иммунного ответа (IL-2, IL-6) и факторов иммуносупрессии (TGF- β 1, TGF- β 2) в стекловидном теле и сыворотке крови животных-реципиентов в течение всего периода наблюдения после трансплантации.

4. На основании комплексного анализа данных клинико-инструментальных, иммунологических исследований и биохимических показателей токсичности определен оптимальный режим комбинированной иммуносупрессивной терапии, включающий однократное интраоперационное интравитреальное введение триамцинолона ацетонида и последующее системное применение препарата микофенолата мофетила для профилактики осложнений, связанных с развитием реакции отторжения ксеногенного клеточного материала ИПСК-РПЭ при его трансплантации в эксперименте.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности полученных результатов определяется достаточным и репрезентативным объемом выборок исследований, работа выполнена с использованием современных методов обследования. Методы статистической обработки результатов адекватны поставленным задачам. Положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, аргументированы и являются результатом многоуровневого анализа. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на научно-практических конференциях с международным участием: XVI Российский общенациональный офтальмологический форум (Москва, 2023);

Международная офтальмологическая научно-практическая конференция «Инновационные технологии в офтальмологии» (Ташкент, 2024); IV Международная конференция «Врач-Пациент-Общество: иммунология, физиология, генетика, биоинформатика и общественное здоровье» приуроченная к 300-летию Российской академии наук (Екатеринбург, 2024). Апробация диссертационной работы состоялась на межотделенческой конференции ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России от 27.11.2024.

Публикации

По материалам диссертации написано 6 работ, из них 4 опубликовано в журналах, рекомендуемых ВАК, 2 – опубликованы в материалах конференции. Получено положительное решение (от 30.10.24) о выдаче патента РФ на изобретение (заявка № 2024109400 от 08.04.2024) «Способ предотвращения отторжения ксеногенного материала при субретинальной ксеногенной трансплантации в эксперименте», соавторы Нероева Н.В., Балацкая Н.В., Нероев В.В., Катаргина Л.А., Бриллиантова А.Г., Измайлова Н.С., Лагарькова М.А.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 128 страницах машинописного текста и состоит из введения и 4 глав, в которых представлены обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, список литературы. Работа иллюстрирована 25 рисунками и 9 таблицами. Библиографический указатель содержит 192 источника (отечественных 39 и зарубежных 153). Диссертация выполнена на базе отделов патологии сетчатки и зрительного нерва (начальник отдела – к.м.н. Н.В. Нероева), иммунологии и вирусологии (начальник отдела – к.б.н. Н.В. Балацкая), взрослого консультативно-поликлинического отделения (заведующий - к.м.н. Н.В. Пак) и научно-экспериментального центра (и.о. начальника отдела Б.В. Витер) ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России в период с 2021 по 2024 гг.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Дегенеративные заболевания сетчатки, связанные с поражением ретинального пигментного эпителия: эпидемиология, патогенез, классификация, клинические особенности

В развитых странах слепота и слабовидение в основном вызваны заболеваниями, связанными с патологией сетчатки. Повреждения РПЭ являются ключевым звеном в развитии дистрофических заболеваний сетчатки и представляют собой серьезную проблему для общественного здравоохранения. Дегенеративные заболевания, связанные с дисфункцией РПЭ, составляют гетерогенную группу, включающую ВМД, наследственные дистрофии сетчатки, такие как пигментный ретинит (ПР), болезнь Штаргардта, болезнь Беста и некоторые другие формы [85]. Прогнозы глобальной распространенности данных заболеваний на следующие 20 лет вызывают опасения и делают разработку инновационных стратегий по лечению этих патологий приоритетной [179]. Несмотря на различную этиологию, эти патологии объединяет прогрессирующий деструктивно-дегенеративный процесс, затрагивающий все клеточные элементы сетчатки, что приводит к нарушению ее целостности и необратимому снижению зрительных функций [97]. Среди различных дегенеративно-дистрофических патологий сетчатки ВМД занимает лидирующие позиции по частоте встречаемости и считается главной причиной необратимой утраты центрального зрения у людей старше 65 лет в развитых странах. Это заболевание, характеризующееся прогрессирующим ухудшением зрения, значительно влияет на качество жизни пожилых людей, ограничивая их способность к самостоятельной деятельности и социальной активности [78]. На эту патологию приходится около 9% всех случаев слепоты [179]. С каждым годом количество пациентов с ВМД значительно увеличивается, в 2020 году у 200 миллионов человек во всем мире был официально установлен диагноз ВМД, а также около 18% населения старше 85 лет имеют данное заболевание [49, 63, 158].

Причинами такого роста заболеваемости является усовершенствование методов диагностики и экспоненциальное старение населения.

ВМД характеризуется поражением макулярной области сетчатки, затрагивает ее наружные слои. Данное повреждение вовлекает в патологический процесс комплекс фоторецептор/РПЭ/мембрана Бруха/хориокапилляры, нарушая их интегральную взаимосвязь. В результате таких изменений происходит утрата центрального зрения, что существенно снижает качество жизни пациентов, ограничивает их способность к выполнению повседневных задач, а также снижает уровень независимости [15, 45, 161, 175].

Этиология ВМД до сих пор остается недостаточно изученной и по-прежнему является предметом активных исследований, что затрудняет разработку эффективных методов профилактики и лечения этой патологии. Несмотря на то, что возраст является основным фактором риска, множество других аспектов, таких как генетическая предрасположенность, образ жизни и сопутствующие заболевания, в том числе дислипидемия и артериальная гипертензия, также могут играть значительную роль в развитии ВМД [48, 139].

Помимо вышеперечисленных факторов, в последние годы были идентифицированы несколько аллелей генетического риска для развития ВМД. Два наиболее важных из них - локусы CFH (фактор комплемента H) и ARMS2 (фактор гиперчувствительности к возрастной дегенерации 2) [102, 108]. Эти две аллели вместе составляют до 45% риска развития ВМД [87].

Несмотря на значительные достижения в офтальмологии, механизмы, лежащие в основе ВМД, остаются малоизученными, тем не менее известна многофакторная природа данного заболевания, что подразумевает сложное взаимодействие метаболических, функциональных, генетических и средовых факторов. Эти факторы не действуют изолированно, а взаимосвязаны между собой, создавая сложную сеть, которая может влиять на развитие и прогрессирование заболевания. В качестве патогенетической гипотезы считается, что очень высокая метаболическая активность макулярной области

предъявляет высокие кумулятивные требования к РПЭ для расщепления и удаления метаболических отходов. ВМД обычно развивается в случае, когда клетки РПЭ больше не могут справиться с этими требованиями в пожилом возрасте [62].

В патогенезе ВМД выделяют несколько важных звеньев, каждое из которых вносит свой вклад в развитие заболевания. Прежде всего, старение клеток сетчатки приводит к её морфологическим изменениям, нарушается гексагональная форма клеток пигментного эпителия, утолщается мембрана Бруха, слой хориокапилляров, питающий наружные слои сетчатки, становится тоньше. Кроме того, с возрастом возникают нарушения в зрительном цикле, нарастают дистрофические изменения в межклеточном матриксе, нарушается липидный обмен. Оксидативный стресс появляется в результате избытка свободных радикалов, вносит большой вклад в развитие и прогрессирование ВМД, вызывая повреждение клеточных структур и нарушая метаболические процессы [10, 12].

Многочисленные исследования подчеркивают, что активация комплемента представляет собой один из ключевых компонентов в развитии и прогрессировании поздней сухой формы ВМД. Наблюдаемые с возрастом увеличение регуляции генов комплемента и белков комплемента приводят к накоплению мембраноатакующих комплексов, что, в свою очередь, способствует воспалительным процессам в сетчатке. Воспалительные цитокины и хемокины, обнаруженные в тканях сетчатки, подтверждают эту гипотезу, указывая на то, что активация комплемента может играть центральную роль в иницировании и поддержании воспалительных реакций, связанных с развитием ВМД [9, 11, 31, 182].

При изменениях в функционировании белков, связанных с системой комплемента, возникает значительный дисбаланс гомеостаза, что, в свою очередь, часто приводит к повреждению здоровых тканей. Недавно ВМД и, в том числе, ГА были добавлены в реестр заболеваний, ассоциированных с

нарушениями в системе комплемента. Кроме того, есть данные, что повышенная активность пути комплемента приводит к образованию друз.

Естественно, изменения белков могут происходить из-за генетических факторов. Известно, что дефицит CFH, основного регулятора в альтернативном пути, приводит к неконтролируемой активации каскада комплемента через альтернативный путь. Общий дефицит CFH и/или любое ингибирование CFH также приведет к сверхактивации [84]. В настоящее время недостаточно клинических данных, чтобы дать представление о конкретных местах в каскаде комплемента, которые влияют на развитие и прогрессирование ГА. Считается, что повышение регуляции CFH, CFB, CFD, CF1, C1, C3 и C5 является фактором риска как развития, так и прогрессирования ГА [92, 182]. Более того, обнаружено, что CFH (HF1/CFH), естественный ингибитор каскада комплемента, накапливается в друзах [3, 92].

Первоначальные исследования класса ингибиторов системы комплемента с целью лечения ГА оказались безрезультатными [69].

Только в 2023 году FDA одобрил 2 препарата пегцетакплан и авацинкаптад пегол, оба представляют собой ингибиторы системы комплемента. Первым в феврале 2023 года одобрили препарат Syfovre (пегцетакплан) компании Apellis Pharmaceuticals – это пегилированный высокоселективный бициклический пептид, который ингибирует расщепление компонента комплемента 3 (C3). В августе 2023 года Американская FDA одобрила препарат Izervay (авацинкаптад пегол) — это ингибитор белка C5 системы комплемента. Они вводятся посредством интравитреальных инъекций и, как было показано, замедляют прогрессирование ГА. Однако оба препарата имеют довольно высокий риск возникновения неоваскулярной формы ВМД, а также больше направлены на профилактику дальнейшего прогрессирования заболевания и не способны восстановить утраченную остроту зрения и/или дефекты поля зрения [82, 94, 100].

В настоящее время наиболее признанной и широко используемой в клинической практике является классификация, предложенная Age-Related Eye Disease Study (AREDS) [77]. Эта классификация представляет собой систематизированный подход к оценке и диагностике ВМД, основываясь на различных стадиях заболевания.

Согласно классификации, разработанной в рамках исследования AREDS, ВМД подразделяется на три основные стадии: раннюю, промежуточную и позднюю. Использование этой классификации позволяет улучшить понимание заболевания, а также оптимизировать подходы к его профилактике и лечению, оценить тяжесть и прогноз заболевания. Ранняя стадия характеризуется наличием множественных мелких друз, небольшим числом друз среднего размера (диаметр от 63 до 124 микрон) или начальными изменениями РПЭ. Данная стадия часто протекает бессимптомно, тогда как у пациентов на двух других последующих стадиях обычно появляются жалобы на метаморфопсии или дефекты центрального поля зрения [158]. Наиболее интересными для изучения представляются поздние стадии ВМД (IV стадия по классификации AREDS), которые вызывают значительное нарушение зрительных функций пациентов и существуют в двух формах: «влажной» экссудативной или неоваскулярной и «сухой» неэкссудативной форме ВМД - «географическая атрофия» (ГА) [1, 5, 32, 113]. Также в связи с совершенствованием методов диагностики в последнее время появились данные о сочетании двух форм ВМД (развитие хориоидальной неоваскуляризации (ХНВ) при существующей ГА или исход ХНВ в атрофию) - смешанный фенотип ВМД [53, 104].

При «влажной» форме ВМД потеря зрения возникает в связи с развитием хориоидальной неоваскуляризации в центральной области сетчатки. Патологическая неоваскуляризация может приводить к разрыву новообразованных сосудов с развитием кровоизлияния и потенциальному формированию фиброза в этой зоне. Неоваскулярная мембрана также часто сопровождается наличием макулярного отека, отслойкой нейрорепителлия и ПЭ

[8, 35]. Все эти осложнения могут привести к резкому снижению остроты зрения, что значительно ухудшает качество жизни пациента. При этом патогенез появления и прогрессирования ГА связан с постепенной гибелью клеток ПЭ, фоторецепторов и хориокапиллярного слоя. Этот медленный и прогрессирующий процесс приводит к постепенному ухудшению зрения, что делает ГА более коварным, так как пациенты могут не сразу осознавать степень потери зрения [98, 113].

ХНВ составляет лишь 10–15% всех случаев ВМД, ее активность возможно замедлить с помощью препаратов с антиангиогенным эффектом (анти-VEGF) [6, 13, 34]. Эти препараты помогают контролировать патологическую неоваскуляризацию, уменьшая риск кровоизлияний и связанных с ними осложнений. Тем не менее, длительное применение анти-VEGF может привести к развитию вторичных атрофических изменений в пигментном эпителии сетчатки, данные изменения могут усугубить состояние центральной зоны сетчатки и привести к прогрессированию зрительных нарушений [19, 175]. Атрофическая ВМД обычно прогрессирует медленно в течение нескольких лет и может привести на поздних стадиях к полной потере центрального зрения, т.е. к центральной скотоме. У пациентов с ВМД часто возникают большие трудности с чтением и распознаванием объектов и лиц, однако пространственная ориентация сохраняется благодаря неповрежденному функционированию периферического зрения.

В настоящее время, несмотря на научные достижения, эффективного лечения ГА не существует, поскольку клетки РПЭ не способны к регенерации [127].

Таким образом, анатомическая целостность и правильная функциональная работа клеток РПЭ являются критически важными для обеспечения нормального зрения. Понимание значимости данных процессов побуждает исследователей искать новые подходы к заместительной трансплантации поврежденных клеток РПЭ, не способных к самообновлению [188].

1.2 Иммунная привилегия субретинального пространства, возможности заместительной трансплантации РПЭ для лечения дегенерации сетчатки

Глаз, аналогично мозгу и репродуктивной системе, обладает иммунной привилегией (ИП) – комплексом регуляторных механизмов, направленных на предотвращение повреждающего действия воспаления, для защиты и сохранения специализированных функций органа зрения.

Термин ИП впервые ввел П. Медавэр в 1948 году как уникальных особенностей органов, при трансплантации в которые чужеродный материал не отторгается, изолированных от организма гистогематическим барьером и не имеющих лимфодренажной системы [125].

Со времен П. Медавэра понятие ИП глаза несколько видоизменилось. Данный феномен принято рассматривать в виде трехуровневой системы защиты органа зрения, которая обеспечивает: 1) изоляцию с помощью гематоофтальмического барьера от системного иммунологического надзора и отсутствия полноценных лимфатических сосудов; 2) подавление местной воспалительной реакции за счет синтеза и продукции растворимых и мембраносвязанных иммуносупрессивных факторов; 3) защиту от инокулированных чужеродных агентов за счет выраженного антиген-специфического подавления системного иммунного ответа Th1 - гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) и параллельной стимуляции синтеза не связывающихся с комплементом IgG1 и с образованием цитотоксических Т-лимфоцитов [61, 64].

Важнейшую роль в обеспечении ИП сетчатки играет гематоретинальный барьер (ГРБ), изолируя ее от контакта с кровью и циркулирующими клетками иммунной системы посредством «пассивного» избирательного механизма транспорта веществ и «активной» экспрессии молекул, которые передают сигналы к развитию апоптоза [61]. Пассивный механизм высокоселективной проницаемости сетчатки достигается за счет уникальных особенностей строения ГРБ: плотных контактов (запирающих

пластинок), соединяющих соседние клетки РПЭ во внешней области барьера и эндотелия сосудов сетчатки во внутренней его области [61].

В случае нарушения механизма, обеспечивающего проницаемость во внешней части ГРБ, при индукции Т-лимфоцитов, способных распознать и пролиферировать в ответ на антигены ткани сетчатки (в частности, при моделировании экспериментального аутоиммунного увеоретинита (ЭАУ)), миграция иммунокомпетентных клеток (ИКК) в сетчатку устраняется за счет «активного» механизма иммунологической защиты - секреции клетками РПЭ мембраноассоциированных форм апоптотических молекул FasL (CD95L), TRAIL, PD-1L [173].

В момент преодоления лейкоцитами гематоретинального барьера, продуцируемый ретинальным пигментным эпителием, FasL индуцирует апоптоз активированных клеток через их взаимодействие с Fas-рецептором (CD 95), который присутствует на большинстве активированных лимфоцитов [76].

Схожий сигнал программируемой клеточной гибели осуществляет TRAIL (от англ. - TNF-related apoptosis-inducing ligand - связанный с TNF лиганд, индуцирующий апоптоз) при помощи рецептора DR5 [76].

Также, Sugita S. и соавт. представили данные о том, что клетки РПЭ в условиях локального воспаления способны к экспрессии костимулирующей молекулы PD-L1 (лиганд запрограммированной смерти 1 (от англ. programmed death-ligand 1)) при обработке их IFN γ in vitro [162].

Основоположники учения об иммунной привилегии глаза Wenkel H. и Streilein J.W. отметили, что способность к конститутивной секреции апоптотических молекул характеризует РПЭ как самостоятельную иммунопривилегированную ткань, которая при пересадке в различные органы может сохранять жизнеспособность продолжительное время [177].

Кроме того, L.Q. и соавт. еще в 1993 г. сообщили, что клетки неонатальной сетчатки при трансплантации в СРП здорового глаза способны к длительному выживанию и дифференцировке [101].

Позднее, в исследовании Weisz J.M. и соавт., выполнивших субретинальную трансплантацию фетального РПЭ в клинике, было отмечено небольшое количество осложнений, стабилизация и улучшение зрительных функции пациентов [176].

Помимо «активной» иммунологической изоляции РПЭ формирует иммуносупрессивную и противовоспалительную среду субретинального пространства (второй уровень ИП). В здоровом глазу РПЭ секретирует множество молекул, обладающих разнообразными биологическими эффектами, в частности, способствует образованию клеточных регуляторных факторов, контролирует активность системы комплемента, глиальных макрофагов и лейкоцитов, при проникновении последних в нейральную ткань (например, при повреждении сосудистой сети сетчатки, воспалении увеального тракта и т.д.).

Так, регуляция системы комплемента (автономный синтез практически всех ее компонентов выявлен в глазу) в сетчатке при нормальных условиях осуществляется белками CFH, C1INH, CD46, CD55, CD59, которые продуцируются РПЭ и, в незначительной степени, клетками Мюллера и нейронами [41].

Существенным для гомеостаза сетчатки является сохранение физиологической активности микроглии, ввиду того что ее элементы – микроглиальные макрофаги – являются клетками врожденного иммунитета. Микроглиальные макрофаги активируются при контакте (в особенности продолжительном) с молекулярными паттернами, связанными с патогенами (PAMPs) и агентами повреждения (DAMPs) при помощи распознающих их рецепторов (PRRs) и способны запускать воспалительные ответы с продукцией IL-1 β , IL-6, TNF α и хемоаттрактантных факторов [1].

В регуляции нормального функционирования микроглиальных клеток принимают участие нейроны, которые поддерживают противовоспалительный фенотип микроглии с помощью прямых контактных нейрон-микроглиальных взаимодействий, проведения регуляторных сигналов

CD200/CD200R и CD47-SIRP (CD172), а также продукции в клеточное микроокружение ряда растворимых молекул, таких как: Fractalkine/CX3CL1 (фракталкин), TGF- β , NGF (фактор роста нервов), TSP-1(тромбоспондин-1), эндоканнабиноиды [67, 124, 137,146].

Клетки РПЭ также обладают способностью к экспрессии мембранного гликопротеина CD200 и продукции TSP-1, что позволяет реализовать «аварийный» нейропротекторный механизм как напрямую с CD200/CD200R, так и через тромбоспондин-1 опосредованное влияние на микроглию (в случае ее активации и миграции в СРП в условиях воспаления) [130, 145].

К локальным иммуносупрессивным факторам, способствующим формированию клеточных регуляторов воспаления (толерогенных антигенпрезентирующих клеток (АПК) и регуляторных ИКК) в сетчатке, относятся цитокины TGF β 2, TSP-1, α -MSH (α -меланоцит стимулирующий гормон), SOM (соматостатин), простагландин E2, RA (ретиноевая кислота) и CTLA-2 α (цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген-2 α) [105, 133, 171, 186].

TGF- β 2 является ключевым супрессивным цитокином в СРП, выполняет основную роль в образовании иммунорегуляторных Т-лимфоцитов, антиген (АГ) специфическое ингибирование системного иммунного ответа при попадании во внутренние камеры глаза антигена и контролирует интраокулярное воспаление [96].

В здоровом глазу TGF- β 2 продуцируется РПЭ (на апикальной стороне) и находится в неактивном состоянии так же как и в системном кровотоке. Чтобы активировать биологические эффекты данного цитокина необходима его активация с помощью протеиназ [171].

Изоформы TGF- β в интраокулярной среде активирует TSP-1, который также продуцируется РПЭ.

Следует отдельно отметить регуляторные нейропептиды, среди которых α -меланоцит стимулирующий гормону (α -MSH) отводят основную роль в формировании внутриглазной иммуносупрессивной среды [171].

Известно, что α -MSH имеет способность модулировать воспалительные реакции у млекопитающих: его влияние на ИКК осуществляется через поверхностные рецепторы меланокортина MCR [86].

Постоянная продукция данного нейропептида определена во влаге передней камеры (ВПК), а также в кондиционированной среде культур клеток РПЭ в концентрациях, демонстрирующих сильное противовоспалительное действие [172].

Представлены данные о том, что α -MSH способен подавлять продукцию $\text{IFN-}\gamma\text{CD4}^+$ Т-лимфоцитами, генерируя регуляторные Т-клетки Treg-клетки ($\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$), продуцирующие TGF- β 1 [170].

РПЭ также конститутивно секретирует CTLA-2 α и ретиноевую кислоту, наличие которых (помимо TGF- β 2 и TSP-1) необходимо для формирования Tregs. Культуры пигментного эпителия сетчатки от мышей с дефицитом секреции ретиноевой кислоты неспособны индуцировать Foxp3+ Tregs [106].

Keino H. и соавт. впервые представили данные о том, что для генерации Tregs ($\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+\text{Treg}$), продуцирующих TGF- β 1 и способных инактивировать аутоиммунные Т-лимфоциты в модели ЭАУ, необходима одновременная секреция клетками РПЭ факторов TGF- β 2, TSP-1, CTLA-2 α (ингибитор катепсина L) и ретиноевой кислоты [106].

Необходимо отметить, что вышеперечисленные механизмы иммунной привилегии СРП и сетчатки (ГРБ, иммуносупрессивные и противовоспалительные свойства локальной среды) не дают полной гарантии ее изоляции, однако, существует дополнительный уровень защиты, заключающийся в АГ-специфическом ингибировании системного иммунного ответа (ГЗТ) в случае попадания АГ непосредственно в камеры глаза [106].

Данный феномен был подробно изучен в экспериментах, проведенных на переднем отрезке глаза и получил название ACAID (от англ. anterior chamber associated immune deviation) - иммунное отклонение, реализуемое ПК глаза [64].

АСАID представляет собой форму антиген специфической толерантности к АГ, инокулированным в ПК, и характеризуется выраженным подавлением ГЗТ и одновременной стимуляцией секреции несвязывающих комплемент IgG1 и цитотоксических Т-лимфоцитов [18, 64, 74, 178].

В эксперименте на грызунах показано, что F4/80+ АПК (радужной оболочки, цилиарного тела), улавливая АГ из передней камеры, проникают в канал Шлемма, далее в кровь, попадают в селезенку, где взаимодействуют с Т-хелперами, $\gamma\delta$ Т-, В- и НКТ-лимфоцитами, генерируют три типа антиген-специфических Treg клеток [106].

Первая популяция Treg состоит из CD4⁺ Т-лимфоцитов, называемых также «афферентными регуляторами», так как они могут подавлять первичную активацию и дифференцировку наивных Т-клеток в эффекторные Th1. Второй тип антиген-специфических Treg-клеток представлен CD8⁺ Т-лимфоцитами – «эфферентными регуляторами», подавляющими Th1 зависимую реакцию ГЗТ.

Третий тип Treg-клеток представлен CD8⁺ Т-лимфоцитами, которые препятствуют переключению В-клеток на формирование плазматиков, синтезирующих изотип IgG, фиксирующий комплемент. Эфферентные CD8⁺ Treg оказывают влияние на периферии (в том числе в глазах), в то время как афферентные CD4⁺ Treg функционируют во вторичных лимфоидных органах [106].

Позднее было обнаружено, что АСАID подобный ответ формируется в том числе при попадании АГ в СРП и в стекловидное тело [61].

Подробные исследования этого феномена установили, что для его индукции требуется активация TGF- β 2 посредством экспрессии TSP-1 [173, 186]. Так, у мышей с нокаутом гена, кодирующего TSP-1 наблюдали отмену АГ-специфического ингибирования реакции ГЗТ на помещенный во внутренние камеры глаза АГ; при этом развившийся ЭАУ не разрешался самостоятельно, как это происходило у мышей дикого типа [186].

Иммунная привилегия СРП создает, по мнению ряда авторов, относительно безопасные условия для трансплантации субретинальных стволовых клеток (СК), которая в настоящее время считается наиболее перспективным подходом к замещению поврежденных элементов сетчатки, а также повышению остроты зрения и качества жизни пациента [143, 189].

Источники РПЭ для трансплантации изучали годами. В настоящее время применяются эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) [7, 21, 50, 37].

Эмбриональные стволовые клетки человека (ЭСК) считаются «золотым стандартом» среди плюрипотентных клеточных линий, благодаря своей способности к самообновлению и дифференцировке в различные типы клеток взрослого организма. Однако этические соображения, связанные с процессом их получения, значительно ограничивают их клиническое применение [50]. Эти вопросы касаются не только моральных аспектов, но и правовых норм, что создает дополнительные барьеры для использования ЭСК в медицине.

В отличие от ЭСК, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) представляют собой перспективную альтернативу, так как они обладают аналогичными морфофункциональными характеристиками. ИПСК могут быть получены из соматических клеток, что исключает этические проблемы, связанные с использованием эмбрионов, что делает их многообещающими для применения в регенеративной медицине и клеточной терапии [116].

Li и соавт. в 2012 году впервые представили доказательства дифференцировки ИПСК в клетки РПЭ (ИПСК экспрессируют его специфические маркеры) при трансплантации в субретинальное пространство. Эти исследования продемонстрировали улучшение показателей электроретинографии в модели пигментного ретинита у мышей, что указывает на функциональную активность трансплантированных клеток [112]. С тех пор в научной литературе было предложено два основных метода доставки

стволовых клеток в субретинальное пространство: введение суспензии клеток и трансплантация в виде предварительно сформированного монослоя клеток на мембране. Эти подходы позволяют оптимизировать процесс трансплантации и улучшить выживаемость клеток после введения [163].

Зарубежные исследования накопили значительное количество публикаций, посвященных субретинальной трансплантации на здоровых глазах у экспериментальных животных. Эти работы подтвердили гипотезу о том, что ИПСК дифференцированные в РПЭ могут выполнять свои функции *in vivo* после введения в СРП. Полученные данные позволили считать клетки ИПСК-РПЭ потенциальными источниками РПЭ для заместительной клеточной терапии, открывая новые перспективы для лечения дегенеративных заболеваний сетчатки.

Davis R. и соавт. продемонстрировали доказательства восстановления зрения у крыс после введения суспензии ИПСК-РПЭ в субретинальное пространство [66].

Интересные данные также представил Stanzel V., утверждая, что трансплантируемые кролику субретинально ИПСК-РПЭ выживали и сохраняли свою полярность в сетчатке [159].

Отсутствия отторжения трансплантата у приматов также добились Zengping Liu и соавт., которые выполняли пересадку ИПСК-РПЭ в виде монослоя на мембране с применением иммуносупрессивной терапии. Период наблюдения равнялся 3 месяцам, за это время отсутствовали серьезные осложнения [114]. Однако в статье нет уточняющих данных о виде, режимах и схеме примененной терапии.

Несмотря на продолжительное время выживания, материал, трансплантированный субретинально, согласно данным ряда научных публикаций, может подвергаться деструкции и гибели.

Так, в исследовании Mc Gill T.J. и соавт., при введении клеток РПЭ макакам-резусам наблюдали отторжение аллотрансплантата [123].

Rezaei K.A. и соавт. продемонстрировали, что ксеногенная трансплантация клеток РПЭ в СРП обуславливает воспалительную реакцию: пересадка материала ЭСК человека индуцировало сильное воспаление хориоидеи [150] и отторжение трансплантата у кроликов [99].

Sugita S. и соавт. наблюдали отторжение донорского материала через 3 недели после трансплантации аллогенных ИПСК-РПЭ без применения иммуносупрессивной терапии [162].

Аналогичные результаты представил Xian B. при пересадке человеческих ИПСК-РПЭ обезьянам в отсутствие иммуносупрессии [181].

Как известно, развитие реакции тканевой несовместимости при аллогенной и ксеногенной трансплантации связано с развитием врожденного и адаптивного (антиген-специфического) иммунного ответа, что подчеркивает необходимость разработки подходов к его подавлению для длительного выживания и оптимального функционирования трансплантата в субретинальном пространстве [22, 91].

По данным литературы без применения иммуносупрессии острое отторжение трансплантата наблюдается в течение первой недели после хирургического вмешательства и вызывается клетками врожденного иммунитета, которые при помощи рецепторов PRRs распознают молекулярные паттерны DAMPs, образуемые во время проведения операции [107, 169].

Мононуклеарные фагоциты (моноциты/макрофаги) МНФ являются важной системой врожденного иммунитета. При пересадках солидных органов специфическим признаком отторжения является инфильтрация МНФ, которые включают воспалительные клетки, мигрирующие из костного мозга, и тканевые макрофаги (ТМ). По данным Tinckam K. присутствие большого количества макрофагов костного мозга говорит об ухудшении клинического исхода [174] и, наоборот, как показали Ma F. и соавт., уменьшение их количества улучшает выживаемость аллотрансплантата [115].

Kennelly К.Р и соавт. сообщили, что аллогенная трансплантация РПЭ в СРП мышей (линии DN01, полученной от здоровых мышей C57BL/10.RIII-H-2r) без применения иммуносупрессии, приводит к отторжению в течение первой недели после хирургического вмешательства. Осуществляется данный механизм за счет клеток врожденного иммунитета, экспрессирующих маркеры CD11b (макрофагами костного мозга), F4/80 (глиальными макрофагами) и Gr1 Ly-6G (нейтрофилами) [107]. Об аналогичном остром отторжении трансплантата РПЭ в СРП у приматов также сообщили McGill T.J. и соавт. [123]. Авторы указанных выше работ считают, что большое количество макрофагов костного мозга и клеток микроглии обнаруженные в воспалительном инфильтрате трансплантата свидетельствуют о важной роли этих клеток в трансплантационном ответе и развитии отторжения в СРП [107, 123, 163].

Как упоминалось выше, микроглиальные клетки – это тканевые макрофаги, которые способны фагоцитировать клеточные остатки (дебрис), регулировать нейроваскулярные взаимодействия. В здоровой сетчатке они расположены во внутреннем и наружном плексиформных слоях, однако не присутствуют в СРП [110, 118, 185]. Глиальные макрофаги являются клетками врожденного иммунитета и могут быстро активироваться в патологических условиях, приобретая амебоидный вид и способность к миграции.

Способность глиальных макрофагов мигрировать в СРП была продемонстрирована в моделях светоиндуцированной дегенерации [135].

Эксперименты, проводимые *in vitro*, продемонстрировали, что в результате трансплантации, высвобождаются DAMPs, которые связываются с TLR, вызывают активацию микроглии, это приводит к переходу в воспалительный фенотип M1, который начинает секретировать TNF α , IL-1 β , IL-6, оксид азота и активные формы кислорода, способствуя усилению воспаления и повреждению нейральной сетчатки [60, 103]. Противовоспалительный фенотип M2, напротив, вырабатывает TGF- β , IL-10, IL-13, [90, 117, 118], нейрогенный онкомодулин (ОСМ), инсулиноподобный

фактор роста (IGF-1) и сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) для восстановления гомеостаза сетчатки [167, 184].

По мнению Petrash С.С., аллотрансплантация РПЭ без применения иммуносупрессивных препаратов может привести к преобладанию патологически активированной М1-микроглии, способствующей отторжению трансплантата, однако при адекватной иммуносупрессивной терапии может быть достигнут переход к противовоспалительному фенотипу М2 [143].

Кроме непосредственной травмы, вызванной оперативным вмешательством, к формированию активированного фенотипа М1-микроглиальных макрофагов приводит дисфункция и повреждение клеток РПЭ, которое может быть вызвано воздействием патогенных и повреждающих стимулов, таких как инфекционные агенты, ультрафиолетовое излучение, накопление токсических веществ, в том числе активных форм кислорода [3].

Негативные факторы способны самостоятельно инициировать и поддерживать секрецию ряда медиаторов, которые ответственны за активацию патологической микроглии, хемотаксис клеток воспаления и развитие иммунного ответа и т.д. [164].

Так, Нероевым В.В. и соавт. при формировании модели атрофии РПЭ было обнаружено повышение экспрессии генов, кодирующих провоспалительные цитокины IL-1 β , IL-18, макрофагальный хемоаттрактантный протеин-1 (MCP-1) в сетчатке. По данным исследования у 27,7% кроликов наблюдали увеличение мРНК IL β и, в 69,6% случаев - усиление локальной экспрессии мРНК MCP-1/CCL2, которые способны повышать проницаемость ГРБ и приводить к отмене иммунной привилегии в СРП [15, 17, 24].

Предполагается, что фармакологическое ведение перехода М1 активированной микроглии в М2 противовоспалительный фенотип в комбинации с иммуносупрессивной терапией может быть в перспективе эффективной стратегией с целью снижения противотрансплантационного

иммунного ответа и, как следствие, приводить к усилению функционирования клеток сетчатки [143].

1.3. Методы предотвращения тканевой несовместимости при трансплантации ретинального пигментного эпителия

На сегодняшний день не существует эффективных методов профилактики тканевой несовместимости как при трансплантации в глаз с атрофией ретинального пигментного эпителия, так и при пересадке в здоровый глаз.

В зарубежной литературе наиболее часто при субретинальной трансплантации применяются кортикостероидные препараты (КС) и циклоспорин А (ЦсА), которые также являются традиционными средствами выбора в офтальмологической практике при пересадках роговицы. Такролимус и микофенолат мофетил (ММФ) применяются несколько реже [42].

Кортикостероидные препараты обладают противовоспалительными, десенсибилизирующими, противоаллергическими и иммунодепрессивными свойствами, а также противошоковым и антитоксическим действиями. Одной из важных характеристик стероидов является их иммунодепрессивная активность. В отличие от цитостатиков, данные свойства КС проявляются в подавлении разных этапов иммунной реакции - торможении миграции стволовых клеток костного мозга и В-лимфоцитов, подавлении активности Т- и В-лимфоцитов, а также угнетении высвобождения цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, интерферона-гамма) из лейкоцитов и макрофагов. Кроме того, КС снижают образование и увеличивают распад белков, составляющих систему комплемента, блокируют Fc-рецепторы иммуноглобулинов.

В 2014 году Stanzel B.V. и соавт. проводили субретинальную ксенотрансплантацию ЭСК-РПЭ кроликам в виде монослоя на мембране с местным и системным применением стероидов. Авторами были получены интересные результаты: в группе, получающей триамцинолона ацетонид локально (интравитреально) интраоперационно выживаемость клеток в СРП

была выше через месяц после трансплантации, по сравнению с группой, которая получала дексаметазон внутримышечно [160].

Позднее, в 2017 году Sugita и соавт. проводили аллотрансплантацию ИПСК-РПЭ в СРП яванских макаков, в исследовании применяли локальное интраопериционное интравитреальное введение триамцинолона ацетонида и его субтеноновое введение через месяц после операции. В результате данная терапевтическая схема способствовала снижению реактивности реципиента [163].

Исследование иммунного отторжения у обезьян при ксенотрансплантации на фоне применения местных стероидов рассматривали в работе Fujii S. и соавт. Для этого экспериментальным животным проводили трансплантацию человеческих ИПСК-РПЭ в СРП. Интравитреальное введение триамцинолона осуществляли интраоперационно, далее через месяц и 3 месяца после трансплантации обезьянам производили субтеноновые инъекции триамцинолона. Комплексная оценка результатов трансплантации РПЭ не выявила признаков отторжения вокруг трансплантатов, аутофлюоресценция (АФ) показала отсутствие ливеджа. Клетки трансплантата РПЭ сохранялись в СРП при гистологическом анализе срезов, что свидетельствовало о способности триамцинолона контролировать локальное иммунное отторжение [83].

В работе Del Priore L.V. с соавт. при субретинальной ксенотрансплантации суспензии ИПСК-РПЭ кроликам-альбиносам применяли «тройная системная» терапия, включавшая преднизолон, циклоспорин и азатиоприн, которая, однако, не способствовала приживлению донорского материала: через 4 недели после операционного вмешательства введенные клетки не определялись в СРП [68].

Длительные системные курсы КС, применение данных препаратов в высоких дозировках может приводить к значительным побочным эффектам, включая диабет, синдром Кушинга, гиперхолестеринемию и остеопороз, а также к неблагоприятным последствиям для глаз: катаракте, стероидной

офтальмогипертензии, глаукоме и, в конечном итоге, к серьезному нарушению зрительных функций [58, 75, 144].

Циклоспорин А (ЦсА) - лекарственный препарат, иммуносупрессант, угнетающий функцию клеточного звена иммунитета и предотвращающий отторжение трансплантированного органа или ткани. Он тормозит развитие клеточного иммунного ответа, включая реакцию «трансплантат против хозяина», кожную гиперчувствительность замедленного типа и продукцию антител, зависимую от Т-хелперов. ЦсА блокирует активацию лимфоцитов в фазах G0 или G1 клеточного цикла, а также синтез и высвобождение цитокинов, в частности, интерлейкина-2, и рост Т-лимфоцитов. Препарат обладает избирательным действием и не угнетает фагоцитарное звено иммунитета.

Благодаря своему иммуносупрессивному эффекту ЦсА подавляет секрецию интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-8) и других цитокинов, таких как ИФН γ , ФНО α , а также снижает выработку ИЛ-6 активными моноцитами. Это действие приводит к снижению воспалительных процессов и уменьшению активности моноцитов, что в свою очередь способствует более успешной интеграции трансплантата. Механизм действия ЦсА называют «селективной иммуносупрессией», что дает ему преимущество перед другими препаратами с цитотоксическим и иммуносупрессивным действием. В отличие от стероидов, ЦсА не снижает работу коры надпочечников и не вызывает нарушений минерального обмена [141].

ЦсА широко применяется в трансплантологии для предотвращения реакции отторжения после имплантации солидных органов, таких как почки, печень и сердце. Его использование позволяет значительно повысить выживаемость трансплантатов и улучшить качество жизни пациентов, что делает ЦсА важным инструментом в арсенале современных методов лечения. [43, 56, 79].

Также в зарубежной литературе имеются работы, посвященные трансплантации РПЭ в эксперименте, с применением ЦсА, однако, их данные достаточно противоречивы.

В исследовании Xian В. и Huang В. использовался триамцинолона ацетонид в комплексе с ЦсА при субретинальной трансплантации у обезьян циномолгусов, данная комбинация улучшала жизнеспособность ксеногенных ИПСК-РПЭ, в то время как в группе животных, не получавших иммуносупрессивную терапию, наблюдали явления отторжения трансплантата [181].

В работе Crafoord S. с соавт. проводили трансплантацию суспензии РПЭ с применением ЦсА в дозе 20 мг/сут., препарат вводился внутримышечно. Через 6 месяцев после операции трансплантированные клетки в СРП отсутствовали. Авторами было сделано предположение, что разрушение аллогенного материала может осуществляться посредством локальных неспецифических иммунологических механизмов, которые не способны блокировать ЦсА [59].

Интересные результаты были получены при ксеногенной субретинальной трансплантации суспензии ЭСК-РПЭ человека кролику с использованием локальной супрессии ЦсА. Экспериментальные животные были разделены на группы, часть получала препарат интравитреально еженедельно (в дозе 0,25-0,5 мг), другой части после локальной криопексии к склере в области плоской части цилиарного тела подшивали капсулу, которая медленно высвобождала препарат в витреальную полость (примерно 2 мкг/сутки). Ксенотрансплантаты РПЭ в глазах, получавших интравитреальный циклоспорин, демонстрировали значительно более длительную выживаемость на протяжении нескольких месяцев по сравнению с контрольными глазами, не получавшими этот препарат. Интересно, что выживаемость ксенотрансплантатов была сопоставима как при использовании капсул медленного высвобождения циклоспорина, так и при проведении

еженедельных интравитреальных инъекций, при этом концентрации циклоспорина в случае капсул были значительно выше [111].

Описан случай длительного выживания человеческих ИПСК-РПЭ при субретинальной трансплантации примату на фоне однократной интравитреальной инъекции триамцинолона (во время трансплантации) и дальнейшего системного (перорального) применения ЦсА [83].

Следует отметить, что ЦсА обладает рядом серьезных системных побочных эффектов - гепатотоксичность, нефротоксичность, повышает риск развития гипертензии, что усложняет его применение у пожилых пациентов [139, 140].

Микофенолата мофетил (ММФ) представляет собой мощный иммуносупрессивный препарат, который широко используется в системной терапии при трансплантации органов и тканей. Он является предшественником активной формы микофеноловой кислоты, которая подавляет синтез гуанозинового нуклеотида за счет ингибирования фермента инозин-5'-монофосфатдегидрогеназы. Это приводит к селективному угнетению пролиферации как Т-, так и В-лимфоцитов, что является ключевым механизмом действия препарата [40].

Исследования показали, что ММФ препятствует взаимодействию эндотелиальных клеток и лимфоцитов, таким образом, ограничивает миграцию последних в очаг воспаления [168].

В культуре лимфоцитов и клеток селезенки человека ММФ подавляет образование антител – основную функцию дифференцированных В-лимфоцитов, ингибирует активацию мезангиальных клеток, избыточную продукцию коллагена и других матриксных белков, снижает выработку ФНО- α и ИЛ-1 [155].

Важно отметить, что ММФ не оказывает существенного влияния на большинство делящихся клеток системы кроветворения, включая клетки-предшественницы нейтрофилов и тромбоцитов, то есть цитостатический эффект ограничивается главным образом лимфоцитами.

ММФ проявляет дозозависимые эффекты понижая экспрессию активационных маркеров (CD134, рецепторов семейства ФНО) лимфоцитов (ядерного антигена пролиферирующих клеток), подавляя образование цитотоксических Т-лимфоцитов [187].

Также ММФ обладает антипролиферативными свойствами в отношении эндотелиальных клеток и фибробластов, а также антиангиогенным эффектом: так, Domhan S. и соавт. при обработке опухолей микофеноловой кислотой *in vivo* наблюдали заметное снижение плотности сосудистой сети и обеднение их покрытия перицитами [70, 89, 128, 129].

Помимо вышеперечисленных эффектов ММФ, сравнительно недавно продемонстрированы его новые свойства: в моделях мышей с пигментным ретинитом Yang P. с соавт. описано нейропротекторное действие препарата, реализуемое посредством подавления циклического гуанозинмонофосфат-зависимого (цГМФ) пути клеточной гибели фоторецепторов. В этой же работе показано, что применение ММФ приводило также к снижению активности микроглии [183].

Первоначально ММФ использовался в 1970-х годах для лечения псориаза и продемонстрировал эффективность при различных видах воспалительных кожных заболеваний. Несмотря на небольшое количество данных о побочных эффектах препарата в работах, посвященных проблемам дерматологии, широкое использование ММФ в общей трансплантологии продемонстрировало в целом его более благоприятный профиль безопасности, чем у ЦсА при пересадках солидных органов [55].

ММФ доказал свою эффективность при ряде аутоиммунных заболеваний, таких как аутоиммунный гепатит, системная красная волчанка и др.

В качестве препарата второй линии ММФ, как и ЦсА применяют для лечения неинфекционных увеитов [93, 153].

Кроме того, в офтальмологии была продемонстрирована эффективность ММФ в предотвращении реакции отторжения трансплантата при пересадках роговицы высокого риска [47, 149].

В ходе исследования, проведенного в ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения России, представлены убедительные свидетельства, что комбинация местных стероидов с ММФ является действенной и существенно повышает частоту прозрачного приживления трансплантата после кератопластики в группе высокого риска [38].

Также ММФ обладает менее выраженной гепато- и нефротоксичностью по сравнению с другими иммуносупрессивными препаратами, включая ЦсА. Это свойство позволяет назначать ММФ на длительный срок, а также использовать его в комбинации с другими иммуносупрессантами, что расширяет возможности терапии и повышает безопасность лечения [81, 116].

Тем не менее, в литературе имеется ограниченное количество исследований, посвященных применению ММФ с целью снижения риска развития отторжения трансплантата при пересадке РПЭ в субретинальное пространство. Доклинические экспериментальные работы, касающиеся использования ММФ в контексте трансплантации РПЭ, также отсутствуют, что подчеркивает необходимость дальнейших исследований в этой области.

Единственное упоминание о применении ММФ в рамках 1-й фазы клинических исследований субретинальной трансплантации суспензии ЭСК-РПЭ, проведенной пациентам с «сухой» формой ВМД и болезнью Штаргардта, приводится в работе Schwartz S.D. В данном исследовании на протяжении 6 недель после трансплантации применяли комбинацию ММФ и такролимуса, в последующие сроки был применен шестинедельный курс иммуносупрессивной терапии, базирующейся только на ММФ. По данным авторов, предложенная схема способствовала выживанию трансплантата в течение длительного периода времени [155].

По мнению Fujii S. и соавт., эффективность иммуносупрессивной терапии зависит от нескольких факторов, таких как вид трансплантации (аутологичная, аллогенная или ксеногенная) и тип трансплантируемых клеток (ИПСК или ЭСК) [83].

Таким образом, выбор стратегии иммуносупрессии должен учитывать как вид трансплантации, так и тип клеток, что подчеркивает необходимость индивидуального подхода к каждому пациенту и ситуации. Это также открывает возможности для дальнейших исследований, направленных на оптимизацию иммуносупрессивной терапии в зависимости от конкретных условий трансплантации.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Общая характеристика экспериментальных групп

Экспериментальная работа была проведена на базе отдела патологии сетчатки и зрительного нерва (начальник отдела – к.м.н. Н.В. Нероева), отдела иммунологии и вирусологии (начальник отдела – к.б.н. Н.В. Балацкая) и на базе научного экспериментального центра (и.о. начальника отдела – Б.В. Витер) ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России в период с 1 октября 2021 г. по 30 сентября 2024 г. Для осуществления экспериментального исследования была использована модель атрофии РПЭ, а также способ субретинальной трансплантации клеток ретинального пигментного эпителия, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. Данные разработки были созданы и запатентованы на базе отдела патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России [26, 27, 28, 29]. На базе лаборатории клеточной биологии ФНКЦ ФХМ ФМБА им. Ю.М. Лопухина (директор - член-корр. РАН, д.б.н. М.А. Лагарькова) были созданы индуцированные плюрипотентные стволовые клетки ретинального пигментного эпителия (ИПСК-РПЭ). Моделирование атрофии РПЭ и трансплантация ИПСК-РПЭ в субретинальное пространство были выполнены к.м.н. П.А. Илюхиным, диссертант ассистировала в ходе оперативных вмешательств. Работа выполнена с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС по охране животных, используемых в научных целях, а также в соответствии с приказом Министерства высшего и среднего специального образования СССР № 742 от 13 ноября 1984 г., правилами надлежащей лабораторной практики (приказ МЗ РФ № 199н от 01.04.2016 г.) и Федеральным законом №61-ФЗ от 12.04.2010 г. «Об обращении 35 лекарственных средств». Проведение экспериментальной работы было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России (протокол № 64/1 от 16.03.2023 г.).

В исследование были включены 54 кролика породы новозеландский альбинос в возрасте 2,5-3,0 месяца и весом 2,0-2,5 кг, из них трансплантация ИПСК-РПЭ проведена 48 животным (48 глаз), которые были распределены на 2 группы:

В **I группе** 24 кроликам (24 глаза) трансплантацию ИПСК-РПЭ производили в здоровый глаз без офтальмопатологии на фоне двух видов комбинированной иммуносупрессивной терапии:

- в **Ia подгруппе** 12 кроликов (12 глаз) получали комбинированную иммуносупрессивную терапию, включающую интравитреальное введение триамцинолона ацетонида и ежедневный прием циклоспорина А с первого дня после трансплантации;

- в **Ib подгруппе** 12 кроликов (12 глаз) получали комбинированную иммуносупрессивную терапию, включающую интравитреальное введение триамцинолона ацетонида и системный прием микофенолата мофетила.

Во **II группе** 24 кроликам (24 глаза) трансплантацию производили в глаз с предварительно смоделированной атрофией РПЭ, индукция которой осуществляли с помощью введения раствора бевацизумаба субретинально. Все кролики аналогично I группе были распределены на подгруппы в зависимости от применяемой схемы КИТ:

- во **IIa подгруппе** 12 кроликов (12 глаз) применяли КИТ, включающую интравитреальное введение триамцинолона ацетонида и ежедневный прием циклоспорина А системно;

- во **IIb подгруппе** 12 кроликов (12 глаз) получали триамцинолона ацетонид и микофенолат мофетил соответственно.

Группу контроля составили соматически здоровые кролики (6 кроликов) без патологии глаз, которым не проводили вмешательства.

2.2 Клинико-инструментальные методы обследования экспериментальных животных

Офтальмологическое обследование экспериментальных животных включало:

1. Биомикроскопию переднего отрезка глаза и придаточного аппарата выполняли с помощью щелевой лампы SL 1800 производства компании «Nidek» (Япония). При осмотре проводили оценку состояния придаточного аппарата глаза, конъюнктивы, роговицы, радужки, хрусталика. Также оценивали прозрачность влаги передней камеры и состояние стекловидного тела (Рисунок 1);

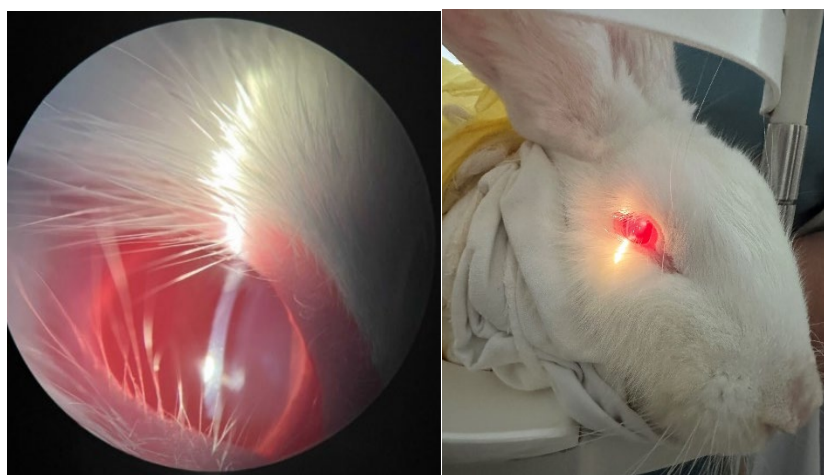


Рисунок 1. Биомикроскопия переднего отрезка глаза кролика через месяц после субретинальной трансплантации ИПСК-РПЭ.

2. Офтальмоскопию глазного дна осуществляли в условиях медикаментозного мидриаза. Исследование проводили на щелевой лампе SL 1800 производства компании «Nidek» (Япония) с использованием бесконтактной асферической линзы 78D (VOLK);
3. Фоторегистрацию заднего отрезка глаза выполняли на ретинальной фундус-камере «Topcon Medical Systems» (США) (Рисунок 2);

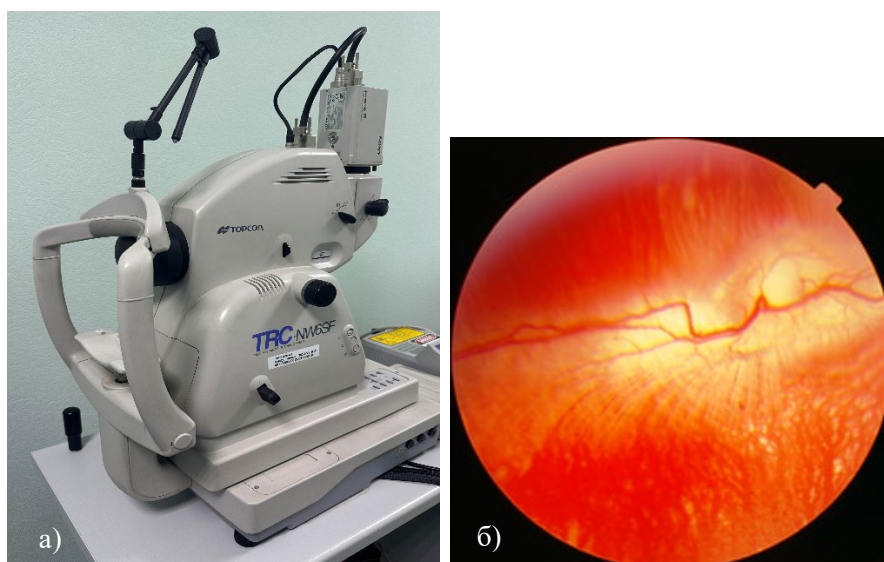


Рисунок 2. а) ретинальная фундус-камера «Topcon Medical Systems» (США); б) фотография глазного дна кролика в норме.

4. Оптическую когерентную томографию выполняли с помощью ретиноангиотомографа Spectralis SD-OCT+HRA «Heidelberg Engineering» (Германия). Оценивали витреоретинальный, ретинохориоидальный, хориосклеральный интерфейс. Данный прибор представляет собой мультимодальное устройство, которое включает в себя технологию спектрального ОКТ (SD-OCT) и конфокальной сканирующей лазерной офтальмоскопии (cSLO) и позволяет получать продольно-поперечные изображения сетчатки и ее объемный скан. Исследование выполняли в следующих режимах: инфракрасное отражательное изображение (IR), синее лазерное флуоресцентное изображение BluePeak (BAF), многоцветное изображение (MultiColor) и EDI-ОКТ (Рисунок 3).



Рисунок 3. Ретиноангиотомограф Spectralis® SD-OCT + HRA фирмы «Heidelberg Engineering» (Германия).

Инструментальные методы исследования включали оптическую когерентную томографию, исследование аутофлюоресценции и в режиме MultiColor, фотографирование глазного дна и выполнены совместно с к.м.н. Н.В. Нероевой и к.м.н. М.В. Рябиной на базе отдела патологии сетчатки и зрительного нерва (руководитель отдела - к.м.н. Н.В. Нероева) и взрослого консультативно - поликлинического отделения (начальник отдела – к.м.н. Н.В. Пак).

2.3 Моделирование атрофии РПЭ, трансплантация суспензии ИПСК-РПЭ, схемы комбинированной иммуносупрессивной терапии

Моделирование атрофии, субретинальная трансплантация ИПСК-РПЭ

На первом этапе 24 кроликам (24 глаза) произвели формирование модели атрофии по раннее разработанной методике в ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» МЗ России [27]. Операцию проводили на правом глазу, оставляя парный глаз для контроля.

Для обеспечения точной дозировки медикаментов перед хирургическим вмешательством у кроликов проводили измерение их массы тела. На основе полученных данных проводили расчет необходимых доз обезболивающих и сопутствующих медикаментов, что способствовало

адекватной анестезии и снижению риска возникновения осложнений как в ходе операции, так и в послеоперационный период. В рамках предоперационной подготовки всем применяли обезболивающие препараты. В частности, использовали 0,3 мл золетила® 50 и 0,55 мл 2 % ксилазина внутримышечно. Эти препараты обеспечивали необходимый уровень анестезии и способствовали снижению стресса у животных перед хирургическим вмешательством. Кроме того, для снижения риска экссудативно-геморрагических осложнений вводили 0,3 мл 0,4% раствора дексаметазона, 0,5 мл этамзилата внутримышечно.

Вигамокс и инокаин инстиллировали в конъюнктивальную полость кроликов непосредственно перед началом оперативного вмешательства, также применялся аппамид для достижения медикаментозного мидриаза. В ходе операции выделяли глазные мышцы и фиксировали их на швы-держалки. В области плоской части цилиарного тела выполняли склеротомии с установкой портов 23 Ga, расположенных соответственно на 2, 10 и 5 часах. На 5 часах устанавливали ирригационная канюля. Затем проводили частичную витрэктомию. Для введения бевацизумаба использовали шприц объемом 1 мл, соединенный с удлинительной трубкой и канюлей 41G DORK, предварительно срезанной под углом 45°. Канюлю вводили через верхневисочный порт в СРП на расстоянии 0,5 rd ниже диска зрительного нерва. После правильного позиционирования кончика канюли, который визуализировался по побледнению сетчатки, препарат в объеме 10 мкл, содержащий 0,025 мг бевацизумаба, вводили субретинально до образования пузыря, хорошо видимого хирургу с помощью операционного микроскопа. Проведение трансплантации ИПСК-РПЭ в СРП в виде суспензии осуществляли через 1 месяц после формирования устойчивой атрофии РПЭ.

Для получения функциональных клеток пигментного эпителия сетчатки человека была произведена направленная дифференцировка из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК), ранее полученных из фибробластов кожи здорового донора в лаборатории

клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России (директор - член-корр. РАН, д.б.н. Лагарькова М.А.). Эти клетки хранили в клеточном банке, что обеспечивало их доступность для дальнейших исследований и экспериментов [36].

Опытным группам, состоящим из 24 кроликов без офтальмопатологии и 24 кроликов с атрофией РПЭ, в СРП вводили клеточную суспензию индуцированных плюрипотентных стволовых клеток ретинального пигментного эпителия (ИПСК-РПЭ). Объем введенной суспензии составил 0,05 мл в количестве 50000 клеток/глаз. Процедуру проводили по отработанной ранее методике трансплантации суспензии в ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» МЗ России [29].

Суспензию с ИПСК-РПЭ вводили СРП до образования пузыря. После этого проводили обмен BSS на воздух. На область введения суспензии наносили 2-3 капли аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы (PRP - Platelet-rich plasma) для обеспечения герметизации и предотвращения рефлюкса стволовых клеток в витреальную полость. После выполнения этих манипуляций осуществляли воздушную тампонаду [28].

Всем кроликам инстиллировали капли дексаметазона 0,1% 3 раза в сутки в течение недели, начиная с первого дня после хирургического вмешательства.

Схема комбинированной иммуносупрессивной терапии

Интраоперационно все экспериментальные животные получили в качестве локальной иммуносупрессии 0,2-0,3 мл триамцинолона ацетонида (40 мг/мл) в виде интравитреальной инъекции после проведения трансплантации ИПСК-РПЭ.

Иммунодепрессант Циклоспорин А (ЦсА) применялся 24 кроликам с целью достижения системной иммуносупрессии с первого дня после операции (подгруппы Ia, IIa). Препарат вводили перорально в виде пищевой смеси в дозе 10 мг/кг в сутки и продолжался до дня выведения из эксперимента.

Данная дозировка ЦсА является экспериментальной и высчитана пропорционально с дозой стандартной для приема при трансплантации солидных органов у человека и на основании зарубежных исследований и опыта приема данного препарата в эксперименте [30, 83]. Также аналогичную дозировку применяли в ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» МЗ России при отработке двух методов доставки клеточного материала субретинально [28, 29].

Остальные 24 кролика (подгруппа Ib, IIb) с первого дня после операции получали селективный иммуносупрессивный препарат ММФ. Препарат вводили перорально в виде пищевой смеси в дозировке 50 мг в сутки.

Указанная дозировка ММФ была рассчитана пропорционально дозе, рекомендуемой для применения при трансплантации солидных органов у человека, и основывалась на зарубежных исследованиях, а также на опыте использования данного препарата у кроликов в экспериментальных условиях. У человека стандартная дозировка составляет 2 г в сутки при среднем весе 70 килограмм [138, 154, 180].

Эффективность микофенолата мофетила была подтверждена в зарубежных контролируемых рандомизированных исследованиях, посвященных его применению в офтальмологии при пересадках роговицы [47, 73].

На 14, 28, 60 сутки после трансплантации выполняли биомикроскопию, переднего и заднего отрезков, фоторегистрацию глазного дна с помощью ретинальной фундус-камеры «Topcon Medical Systems» (США), ОКТ в инфракрасном режиме, в режимах Multicolor и АФ с качественной и морфометрической оценкой структуры сетчатки на ретиноангиотографе Spectralis «Heidelberg Engeneering» (Германия).

Получение биоматериала экспериментальных животных

Забор крови у кроликов производили из ушной вены в стерильные пробирки с активатором свертывания до трансплантации и на 14, 28, 60 сутки наблюдения.

В эти же сроки, после взятия крови и проведения офтальмологических исследований, кроликов выводили из эксперимента методом воздушной эмболии в ушную вену. После этого автор самостоятельно производил забор стекловидного тела (СТ) для дальнейшего анализа (Рисунок 4).

Собранный биоматериал передавали в Отдел иммунологии и вирусологии, где по стандартным методикам была проведена пробоподготовка: из крови животных получена сыворотка (СК), пробы которой аликвотировали, переносили в пробирки «Eppendorf» и хранили при температуре -70°C до проведения исследований.

Образцы СТ хорошо перемешивали, разделяли на аликвоты и в пробирках «Eppendorf» переносили на хранение в условия глубокой заморозки.

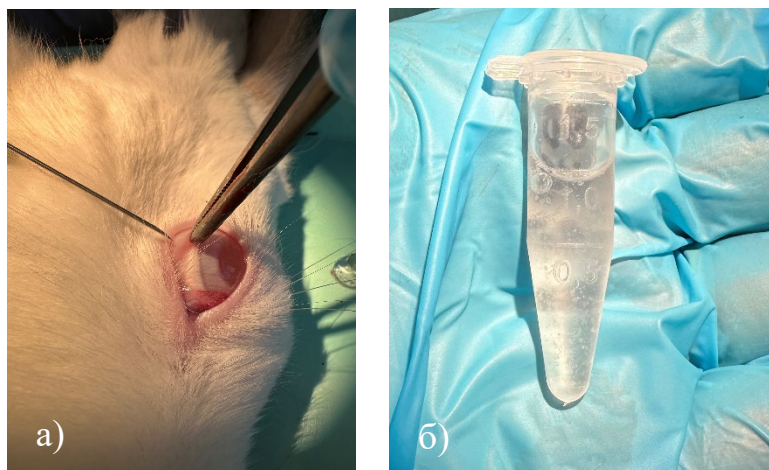


Рисунок 4. а) процесс забора СТ; б) эппендорф с собранным материалом (СТ).

2.4 Иммунологические методы исследования, оценка токсичности системных иммуносупрессорных препаратов, применяемых в составе КИТ

Иммунологические исследования выполняли в отделе иммунологии и вирусологии ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» Минздрава России (начальник отдела - вед. науч. сотрудник, к.б.н. Н.В. Балацкая).

Содержание IL-2, IL-6, TGF- β 1, TGF- β 2 и TSP-1 в СТ и СК животных-реципиентов и группы контроля определяли при помощи твердофазного ИФА (иммуноферментного анализа). С этой целью использовали специализированные тест-системы «Blue Gene» (КНР) и «Cloud-Clone Corp» (США), детектирующие искомые аналиты в биологических жидкостях кроликов. Исследование проводили в соответствии с протоколом постановки, разработанным производителем. Результаты реакции учитывали на мультифункциональном микропланшетном фотометре – имиджере Cytation 5 («BioTek», США) при длине волны 450 нм (Рисунок 5).



Рисунок 5. Спектрофотометр Cytation 5 (Biotek).

С целью оценки токсичности иммуносупрессивных препаратов ЦсА и ММФ в СК животных-реципиентов до начала курса КИТ и через 14 и 60 дней после иммуносупрессивной терапии, определяли уровень АЛТ, АСТ, мочевины и креатинина. Эти же показатели оценивали у животных группы контроля. Биохимические исследования выполняли на автоматическом

анализаторе Mindray (КНР) согласно инструкциям фирмы-производителя (совместно с вед. науч. сотрудником, к.б.н. Балацкой Н.В.).

2.5 Статистическая обработка результатов исследования

Обработка и анализ данных проведен автором самостоятельно, с применением пакета прикладных статистических программ MS Excel и Biostat v5. Учитывая небольшие по численности выборки распределение части параметров, отличное от нормального, сравнительный анализ проводили непараметрическими методами. Иммунологические и биохимические параметры представлены в виде $Me [Q1; Q3]$, где Me - медиана, $Q1$ - первый, $Q3$ - третий квартили. Для определения статистической значимости различий (p) показателей двух независимых выборок использовали U -критерий Манна-Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Оценка изменений системной и локальной продукции медиаторов иммунного ответа и супрессивных цитокинов при атрофии РПЭ в эксперименте

Результаты исследования концентрации иммуномедиаторов в СК и СТ групп животных без офтальмопатологии и с атрофией РПЭ представлены в таблицах 1 и 2.

В ходе исследования СТ обнаружено, что TGF- β 1 отсутствовал во всех тест-пробах как у здоровых особей, так и у кроликов с дегенерацией РПЭ, что соответствует результатам, полученным Hirsch L. и соавт., которые продемонстрировали, что TGF- β 2 является основным цитокином, продуцируемым конститутивно в культуре клеток РПЭ. TGF- β 1, в отличие от TGF- β 2, синтезируется исключительно в базальной области клеточного пласта пигментного эпителия в незначительных (слабо детектируемых) количествах [96].

Медиана показателя TGF- β 2, ключевого супрессорного медиатора интраокулярных жидкостных сред, синтезируемого клетками всех тканей глаза, в СТ животных без офтальмопатологии находилась на отметке 1061 пг/мл (при минимуме 467 пг/мл и максимуме 2123 пг/мл) (Таблица 1).

В СТ в группе с атрофией РПЭ локальное содержание этого цитокина статистически значимо превышало (в два раза) таковое в норме и составило 2195 пг/мл ($p < 0,05$). Обнаруженное нами усиление местной продукции TGF- β 2, имеющего ключевое значение в регуляции интраокулярного воспаления, может представлять компенсаторную реакцию со стороны клеток сетчатки, вызванную повреждением РПЭ (Таблица 1).

Известно, что после биосинтеза обе изоформы, как TGF- β 1, так и TGF- β 2, находятся в латентном состоянии: их переход в активную форму требует присутствия TSP-1 (тромбоспондина-1), обладающего протеазной активностью [120, 121].

Конститутивная продукция TSP-1 в сетчатке осуществляется РПЭ. Данный белок нами выявлен во всех изучаемых тест-пробах СТ: размах его показателя в контроле находился в диапазоне от 1,08 до 2,08 нг/мл, медиана составила 1,21 нг/мл. В группе с атрофией РПЭ уровень интраокулярной продукции TSP-1 был значимо выше и составил 10,1 нг/мл ($p < 0,05$) (Таблица 1), что указывает на активацию локальных репаративных механизмов, в реализации которых, как известно, участвует этот протеин [122, 130, 148].

IL-2 – основной цитокин адаптивного иммунного ответа обнаружен нами в СТ всех животных с атрофией РПЭ и в подавляющем большинстве тест-проб группы без офтальмопатологии.

Как известно, IL-2 вырабатывается активированными Т-лимфоцитами, в основном, Т-хелперами 1 типа (Th1); его также могут кратковременно продуцировать антигенпрезентирующие клетки.

В контексте вышеуказанного положения, факт выявления нами IL-2 в среде здоровых глаз, практически свободной от иммунокомпетентных клеток, выглядит парадоксальным (Таблица 1).

Тем не менее, несмотря на сложность объяснения данного явления, результаты исследований Girard S. и соавт. (2008) и Serrano-Perez M.C. и соавт. (2011) указывают на возможность синтеза IL-2 клетками астроглии без участия Т-лимфоцитов.

В нашей работе выявлено значительное повышение локального уровня IL-2 при атрофии РПЭ (медиана составила 2195 пг/мл) по сравнению с группой без офтальмопатологии (медиана составила 1061 пг/мл) ($p < 0,05$), что дает основание предполагать о формировании активированного фенотипа микроглии вследствие повреждения пигментного эпителия (Таблица 1) [88, 156].

IL-6 является медиатором острой фазы иммунного ответа, его продукция осуществляется активированными Т-клетками и макрофагами, интраокулярно его синтез индуцируется при токсическом воздействии на

РПЭ, например, друзами при ВМД. IL-6 активно синтезируется микроглиальными макрофагами в ответ на повреждающие стимулы [3].

В ходе исследования нами не было отмечено существенной разницы в интраокулярной продукции между сравниваемыми группами: так, в СТ животных без офтальмопатологии медиана IL-6 составила 1,44 пг/мл, в группе атрофии РПЭ его значение составило 1,41 пг/мл (Таблица 1).

Таблица 1. Анализ содержания цитокинов иммунного ответа и факторов иммуносупрессии в СТ животных с атрофией РПЭ и без офтальмопатологии (в норме).

Наименование показателя	Содержание цитокинов в СТ животных основных групп (Ме; Q1-Q3)	
	Интактный РПЭ (n=6)	Атрофия РПЭ (n=6)
TGFβ1 (пг/мл)	0 (0,0– 0,0)	0,0 (0,0-0,0)
TGFβ2 (пг/мл)	1061 (467– 2123)	2195* (1581-2809)
TSP-1(нг/мл)	1,21 (1,08–2,08)	10,11* (8,48-11,74)
IL-2 (пг/мл)	1,2 (0,0– 10,2)	13,7* (6,9– 19,3)
IL-6 (пг/мл)	1,44 (1,29–1,74)	1,41 (1,2-1,53)

Примечание:

n - число глаз в группе;

* - статистически значимое отличие при сравнении показателей основных групп ($p < 0,05$);

Цветом обозначены статистически значимые отличия.

В таблице 2 представлены результаты сравнительного анализа содержания изучаемых цитокинов в СК кроликов без офтальмопатологии и моделей с атрофией РПЭ.

TGF-β1 определялся в 100% тест-проб СК экспериментальных животных обеих групп.

В СК кроликов с атрофией РПЭ было выявлено выраженное статистически значимое снижение уровня указанного цитокина по сравнению с таковым в группе контроля ($p < 0,05$), что указывает на снижение системной

иммунологической толерантности (на уровне организма). Так, медиана сывороточного TGF- β 1 в группе животных без офтальмопатологии составила 469 пг/мл, в группе же с атрофическими изменениями РПЭ - 146 пг/мл (в 4 раза ниже нормы) (Таблица 2).

Анализ системной продукции TGF- β 2 показал достоверное ее повышение в группы с поражением РПЭ относительно нормы ($p < 0,05$), а концентрация указанного цитокина в СК животных-моделей составила 1242 пг/мл (диапазон концентраций – 1126-1358 пг/мл) (Таблица 2).

Также в СК животных с атрофией РПЭ по сравнению с контролем наблюдали достоверное, более чем в 5 раз снижение уровня TSP-1, достигшего отметки 0,99 нг/мл ($p < 0,05$). Изменение системной продукции TSP-1 может указывать на глубокие нарушения и дизрегуляцию защиты на уровне организма, связанные с повреждением ретинального пигментного эпителия.

При сравнительном анализе содержания IL-6 в СК не выявлено существенных отличий между изучаемыми группами: значение показателя составило 0,99 пг/мл у кроликов без офтальмопатологии и, соответственно, 1,1 пг/мл - с атрофией РПЭ (Таблица 2).

Интересные данные были получены при изучении системной продукции IL-2: в первую очередь, обращают на себя внимание 100%-ная выявляемость цитокина в тест-пробах группы контроля, а во вторую – диапазон значений показателя (Таблица 2). Анализируя диапазон изменения концентраций IL-2 в крови животных без патологии глаз, можно заключить, что их количества варьируют от умеренных до весьма высоких значений при минимуме - 4,9 пг/мл и, соответственно, максимуме – 16,09 пг/мл (Таблица 2).

Только в 2 тест-пробах СК животных с атрофией РПЭ обнаружен IL-2. Данное обстоятельство позволяет думать о глубоких нарушениях иммунологической регуляции на уровне организма при атрофическом поражении РПЭ.

Таблица 2. Оценка изменений содержания иммунорегуляторных цитокинов и факторов супрессии в СК животных с атрофией РПЭ.

Наименование показателя	Содержание цитокинов в СК животных основных групп (Me; Q1-Q3)	
	I Интактный РПЭ (n=6)	II Атрофия РПЭ (n=6)
TGFβ1 (пг/мл)	469 (402– 584)	146* (125– 166)
TGFβ2 (пг/мл)	1041 (427– 1143)	1242* (1126-1358)
TSP-1 (нг/мл)	5,17 (3,55–6,77)	0,99* (0,63-1,34)
IL-2 (пг/мл)	10,5 (4,9– 16,09)	0,0 (0,0-11,2)
IL-6 (пг/мл)	0,99 (0,93–1,95)	1,1 (0,82-1,6)

Примечание:

n - число глаз в группе;

* - статистически значимое отличие при сравнении показателей основных групп ($p < 0,05$).

Цветом обозначены статистически значимые отличия.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что атрофия РПЭ ассоциируется с локальными и системными нарушениями продукции цитокинов иммунного ответа и факторов иммуносупрессии, что указывает на снижение толерантности на уровне глаза и организма и необходимость применения комбинации иммуносупрессивных средств (действующих на уровне глаза/организма) при трансплантации ИПСК-РПЭ.

3.2 Анализ результатов клинико-инструментальных исследований после трансплантации суспензии ИПСК-РПЭ в группах животных без офтальмопатологии и с моделью атрофии РПЭ в эксперименте при использовании двух схем комбинированной иммуносупрессии

Иммунная привилегия глаза (ИП) создает относительно безопасные условия в СРП для проведения трансплантации. Тем не менее, согласно данным литературы, ксенотрансплантация человеческих ИПСК-РПЭ приводит к отторжению клеточного материала и развитию воспаления в заднем отрезке глаза, особенно при отсутствии иммуносупрессивной терапии [150].

С целью борьбы с отторжением ксенотрансплантата традиционно используются кортикостероидные препараты и ЦсА. Однако анализ результатов исследований показал, что использование этих препаратов в монотерапии может не только приводить к развитию неблагоприятных побочных эффектов (местных – прогрессирование катаракты, офтальмогипертензия, глаукома; системных – гепато-и нефротоксичность), но и являются недостаточно эффективными для сохранения трансплантированного РПЭ в СРП [99, 108].

Также важным для внедрения в клинику трансплантации РПЭ является тот факт, что у пациентов с дегенерацией сетчатки (в том числе с ВМД) отсутствует иммунная привилегия в СРП в связи с атрофическим повреждением клеток РПЭ, что приводит к развитию воспаления в заднем полюсе и последующему ослаблению системной иммунной толерантности организма [17, 25].

Одним из способов борьбы с отторжением может стать использование КИТ, которая воздействует как на локальное воспаление в СРП, так и на системную иммунную реакцию.

Подтверждением является случай, описанный в работе Fujii S. и соавт. В исследовании проводили ксеногенную трансплантацию ИПСК-РПЭ яванской макаке на фоне интравитреального введения триамцинолона и

системного применения ЦсА [83]. Однако в данном исследовании трансплантацию осуществляли в здоровый глаз, то есть в условиях интактной иммунной привилегии глаза, в то время как в перспективе трансплантация СК будет проводиться пациентам с компрометированной ИП в СРП.

В связи с выраженными побочными эффектами при длительном применении ЦсА и пожилой когортой пациентов, которым потребуется заместительная трансплантация клеток РПЭ, необходим поиск альтернативной менее токсичной иммуносупрессивной системной терапии. Одним из успешно используемых препаратов в общей трансплантологии является иммунодепрессант метаболического типа - ММФ, он также успешно работает при пересадках роговицы высокого риска [47].

В настоящем исследовании проведен клинико-иммунологический анализ эффективности и безопасности трансплантации суспензии ИПСК-РПЭ в СРП с применением ЦсА и ММФ в составе КИТ в эксперименте на кроликах.

Эксперимент выполнен на 54 кроликах-самцах породы Новозеландский альбинос (возраст 2,5-3,0 мес., вес 2,0-2,5 кг), из которых 48 животным (основные группы) проводили трансплантацию 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.

Животные-реципиенты были распределены на две группы: I группе (24 глаза) субретинальную трансплантацию проводили в здоровый глаз с интактным РПЭ; II группе (24 глаза) введение суспензии осуществлялось в область заранее сформированной дегенерации РПЭ по ранее разработанной методике в ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца». МЗ России Группу контроля составили 6 здоровых кроликов без соматической патологии, которым не проводилось никаких хирургических вмешательств. Все экспериментальные животные основных групп получали КИТ, в качестве локального иммуносупрессора применялся Триамцинолона ацетонид, который вводили интравитреально интраоперационно (40 мг/мл). ЦсА или ММФ применялись

в качестве системного компонента ежедневно со дня трансплантации до окончания наблюдения. Подгруппы Ia, IIa получали ЦсА в составе КИТ, подгруппа Ib, IIb - ММФ. Оценку результатов субретинальной трансплантации ИПСК-РПЭ в виде суспензии выполняли с помощью стандартных и специализированных офтальмологических методов: биомикроскопии, ОКТ, АФ в режиме MultiColor, фоторегистрации глазного дна на 14, 28, 60е сутки после хирургического вмешательства.

3.2.1 Анализ клинических результатов трансплантации суспензии ИПСК-РПЭ в здоровый глаз экспериментальных животных с применением разных режимов комбинированной иммуносупрессивной терапии (КИТ)

Кроликам из подгруппы Ia, Ib со здоровым РПЭ проводили трансплантацию суспензии РПЭ в субретинальное пространство. Через 14, 28 и 60 суток после пересадки проводили офтальмологические исследования, в том числе специализированные. Снимки ОКТ, данные измерений толщины сетчатки представлены на рисунках 6,7,8 и в таблице 3.

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

При офтальмоскопии в эти же сроки наблюдения во всех подгруппах на фоне двух режимов КИТ не визуализировали патологических изменений на глазном дне (не наблюдали воспалительных явлений в переднем и заднем отрезке глаза, не отмечено случаев отслойки сетчатки, образования шварт, кровоизлияний, экссудатов, побледнений сетчатки, патологических очагов).

На рисунке 4а представлен ОКТ-срез здоровой сетчатки кролика до проведения оперативного вмешательства.

При проведении ОКТ у кроликов с интактным РПЭ на 14 сутки как на фоне ЦсА, так и ММФ в составе КИТ профиль сетчатки не был изменен, все

ее слои дифференцировались, под нейросенсорной сетчаткой визуализировалась зона умеренной гиперрефлективности, соответствующая локализации трансплантированных клеток (Рисунок 6б, 7б).

На фоне применения ЦсА и ММФ в составе КИТ к 28 суткам наблюдения и далее к 60 суткам отмечали более ровную регулярную гиперрефлективность монослоя под нейросенсорной сетчаткой, позволяющая говорить о распределении субретинально введенного клеточного материала (желтая стрелка) и «стремлении» РПЭ к «правильной» ориентации в виде монослоя клеток. В эти же сроки по данным ОКТ профиль и структура сетчатки оставались неизменными (Рисунок 6в, 7в).

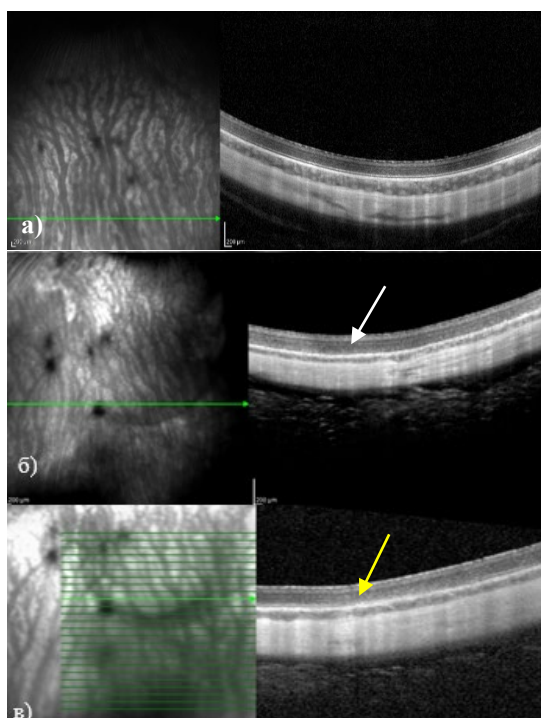


Рисунок 6. ОКТ-снимки, выполненные в разные сроки наблюдения при субретинальной трансплантации ИПСК-РПЭ животным Ia подгруппы, горизонтальный срез: а) до операции; б) на 14 сутки после трансплантации; в) на 28 сутки.

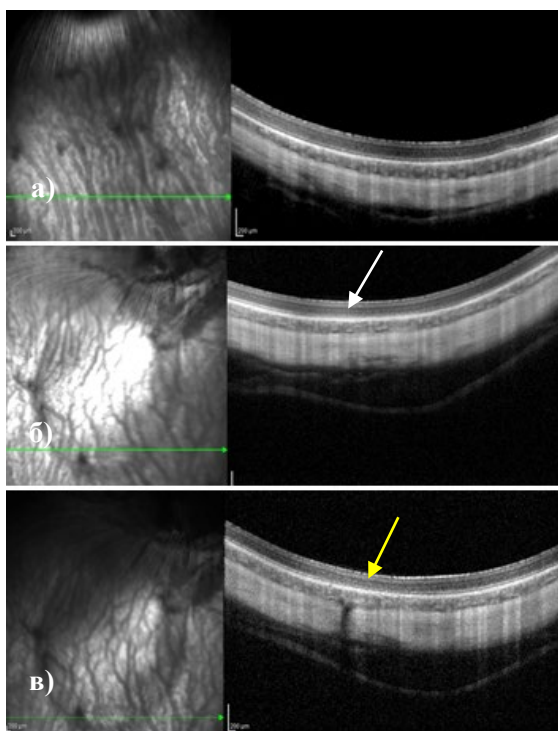


Рисунок 7. ОКТ-снимки, выполненные в разные сроки наблюдения при субретинальной трансплантации ИПСК-РПЭ животным Ib подгруппы, горизонтальный срез: а) до операции; б) на 14 сутки; в) на 28 сутки.

Также всем экспериментальным животным проводили исследование АФ, на рисунке 8а представлен снимок здоровой сетчатки кролика до проведения трансплантации ИПСК-РПЭ, характеризующийся ровной гомогенной изоаутофлюоресценцией.

На 14 сутки после трансплантации наблюдали неравномерную аутофлюоресценцию (чередование мелких фокусов гипер- и гипофлюоресценции), соответствующую месту скопления трансплантированных клеток (желтый круг), к 28 суткам и далее аутофлюоресценция становилась более равномерной, что являлось косвенным благоприятным признаком перераспределения клеточной суспензии в субретинальном пространстве с тенденцией к организации в виде монослоя (белый круг) (Рисунок 8б, 8в). Данные АФ на фоне КИТ с системным применением ЦсА (подгруппа Ia) были сопоставимы с результатами АФ на фоне использования ММФ (подгруппа Ib).

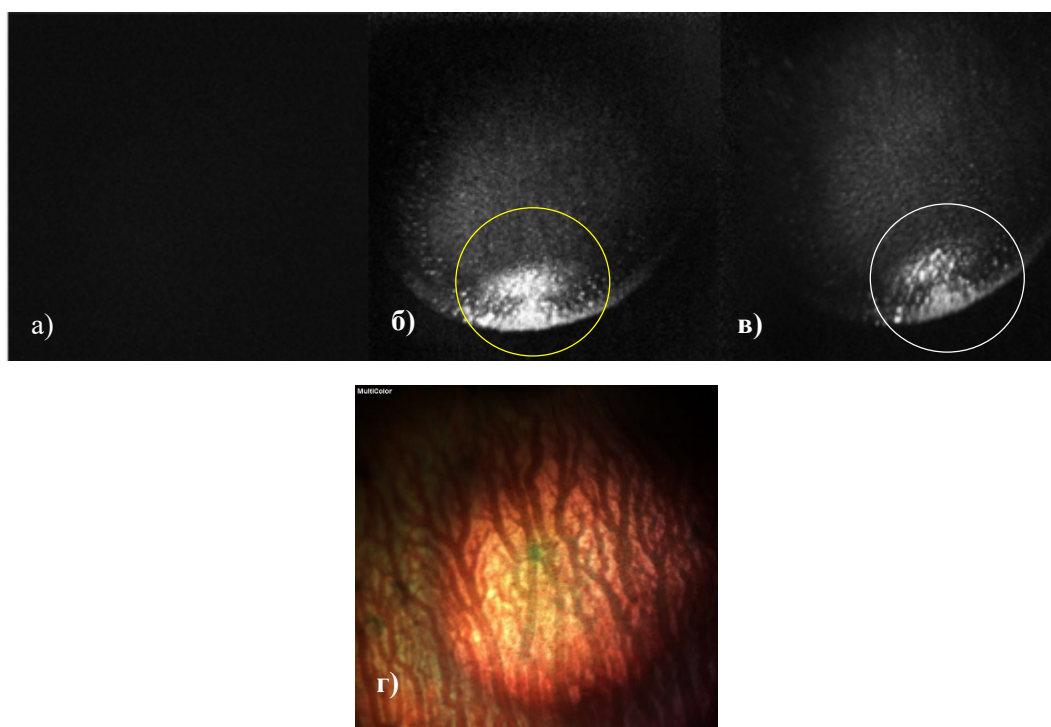


Рисунок 8. Исследование АФ и в режиме MultiColor, выполненное в разные сроки наблюдения при субретинальной трансплантации ИПСК-РПЭ животным Ia подгруппы: а) до операции; б) на 14 сутки; в) на 28 сутки; г) визуализация области введения клеток в режиме MultiColor.

Анализ показателей толщины сетчатки до проведения трансплантации соответствовал значениям нормы, установленной в работах Davis F.A., (1929 г.), и в более позднем исследовании Xiao-Xu Z. и соавт. в 2012 г., как в подгруппе, получающей ЦсА, так и ММФ в составе КИТ [65, 191].

Итак, медиана в Ia подгруппе, получающей ЦсА, составила 150 мкм, и 152 мкм в Ib подгруппе с системным применением ММФ. Статистически значимых различий при сравнении подгрупп до трансплантации, а также на разных сроках наблюдения после пересадки ИПСК-РПЭ в СРП кролика выявлено не было [23].

Таблица 3. Показатели толщины сетчатки (мкм) в разные сроки наблюдения до и после трансплантации ИПСК-РПЭ в здоровый глаз на фоне двух схем КИТ.

Сроки наблюдения (сутки)	Толщина сетчатки (мкм) в подгруппах (Me; Q1-Q3)	
	Ia -ЦсА (n=12)	Ib-ММФ (n=12)
0 (до трансплантации)	150 (100-160)	152 (107-165)
14	135 (100-177)	138,5 (121-166)
28	135 (100-160)	137 (111-170)
60	128 (104-150)	131,5 (109-155)

Примечание:

n - количество глаз в группе.

3.2.2 Анализ клинических результатов трансплантации суспензии ИПСК-РПЭ моделям с атрофией ретинального пигментного эпителия на фоне двух схем КИТ

Экспериментальным животным из подгрупп Ia и Ib также проводили аналогичные стандартные и специализированные офтальмологические обследования в те же сроки наблюдения.

При анализе результатов биомикроскопии и офтальмоскопии на ранних и отдаленных сроках после трансплантации в обеих подгруппах, как на фоне ЦсА, так и ММФ, не было выявлено признаков воспаления переднего и заднего отрезков глаза. Также не было обнаружено патологических изменений на глазном дне (не отмечено случаев отслойки сетчатки, образования шварт, кровоизлияний, экссудатов, побледнений сетчатки, патологических очагов и др.)

В двух подгруппах до проведения трансплантации по данным ОКТ обнаруживали область гиперрефлективности хориоидеи, связанная с повышенным проникновением сканирующего луча в подлежащие ткани за счет атрофии РПЭ (Рисунок 9а, 10а -желтая скобка).

На 14 сутки после субретинального введения суспензии ИПСК-РПЭ профиль сетчатки не изменялся, слои сетчатки дифференцировались, на ОКТ-срезах не было выявлено признаков воспаления и других патологических изменений сетчатки (Рисунок 9б, 10б).

В позднем периоде наблюдения (28-60 сутки) отмечали уменьшение проникновения под сетчатку лазерного сканирующего луча (за счет повышения отражательной способности трансплантата) и, как следствие этого, уменьшение гиперрефлективности хориоидеи. Эти изменения расценивали как благоприятные признаки частичного восстановления РПЭ. Осложнений и отрицательной динамики не было выявлено, слои сетчатки дифференцированы (Рисунок 9в, 10в).

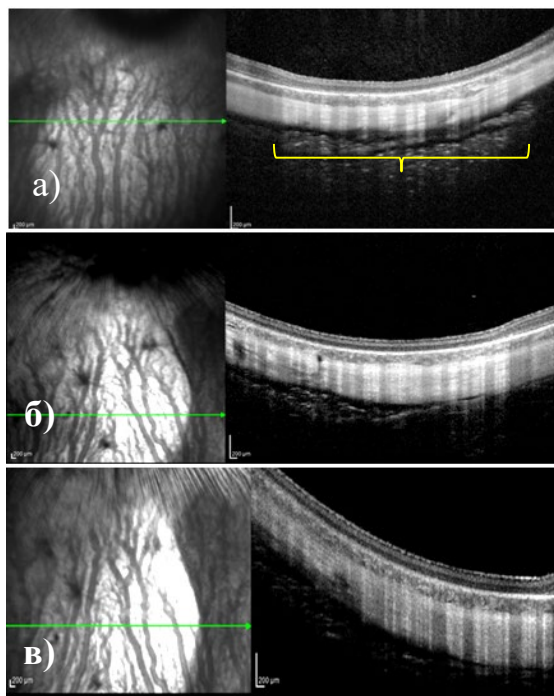


Рисунок 9. ОКТ-снимки, выполненные до вмешательства и в разные сроки после проведения субретинальной трансплантации ИПСК-РПЭ животным в глаз атрофией РПЭ (подгруппа IIa), горизонтальный срез: а) до операции; б) на 14 сутки; в) на 28 сутки.

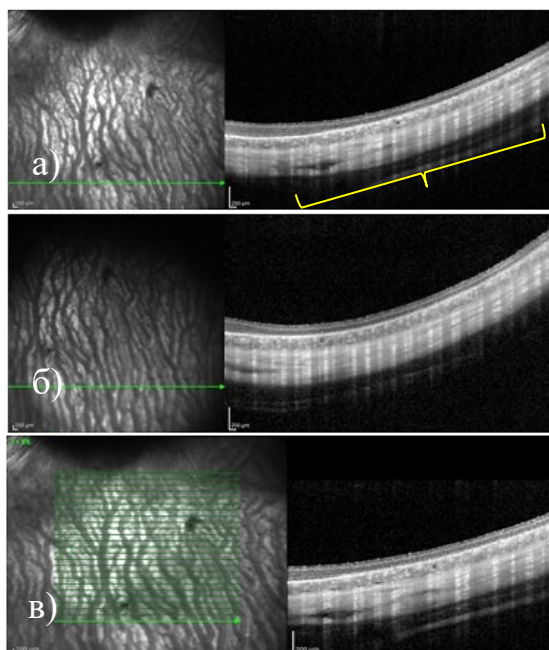


Рисунок 10. ОКТ-снимки, выполненные до и в разные сроки наблюдения после проведения субретинальной трансплантации ИПСК-РПЭ животным в глаз с атрофией РПЭ (подгруппа IIb), горизонтальный срез: а) до операции; б) на 14 сутки; в) на 28 сутки.

На рисунке 11а представлен снимок сетчатки кролика через месяц после формирования атрофии РПЭ с помощью бевацизумаба до проведения трансплантации ИПСК-РПЭ. На снимке визуализируется округлый фокус неравномерной аутофлюоресценции с чередованием мелких фокусов гипо- и гиперфлюоресценции. Патологическая область соответствует зоне повреждения клеток РПЭ. Наличие иррегулярной гиперфлюоресценции объясняется накоплением липофусцина, связанным с дисфункцией РПЭ. Данные ОКТ и АФ коррелировали с результатами гистологических исследований, проведенных в ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» МЗ России, в которых сообщали о развитии апоптотических изменений и дисфункции клеток РПЭ со скоплением избыточного количества липофусцина [2].

На 14 сутки после проведения трансплантации суспензии ИПСК-РПЭ наблюдали неравномерная крапчатая аутофлюоресценция, к 28 суткам и далее отмечалась тенденция к выравниванию аутофлюоресценции, уменьшению количества мелких точечных фокусов гиперфлюоресценции. Эти изменения могут свидетельствовать о частичном восстановлении анатомии и функции

РПЭ (о чем свидетельствует резорбция липофусцина) (Рисунок 11б, 11в). Полученные результаты согласуются с данными морфологии, полученными в ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» МЗ России. Лагарькова М.А. и др. опубликовали результаты трансплантации, где визуализировали клетки ИПСК-РПЭ, которые встраивались между собственными клетками РПЭ кролика [2]. Данные АФ на фоне КИТ с системным применением ЦсА (подгруппа Ia) коррелировали с результатами АФ на фоне использования ММФ (подгруппа Ib). В режиме MultiColor визуализируется четко очерченный круг сформированной атрофии РПЭ (Рисунок 11г) [23].

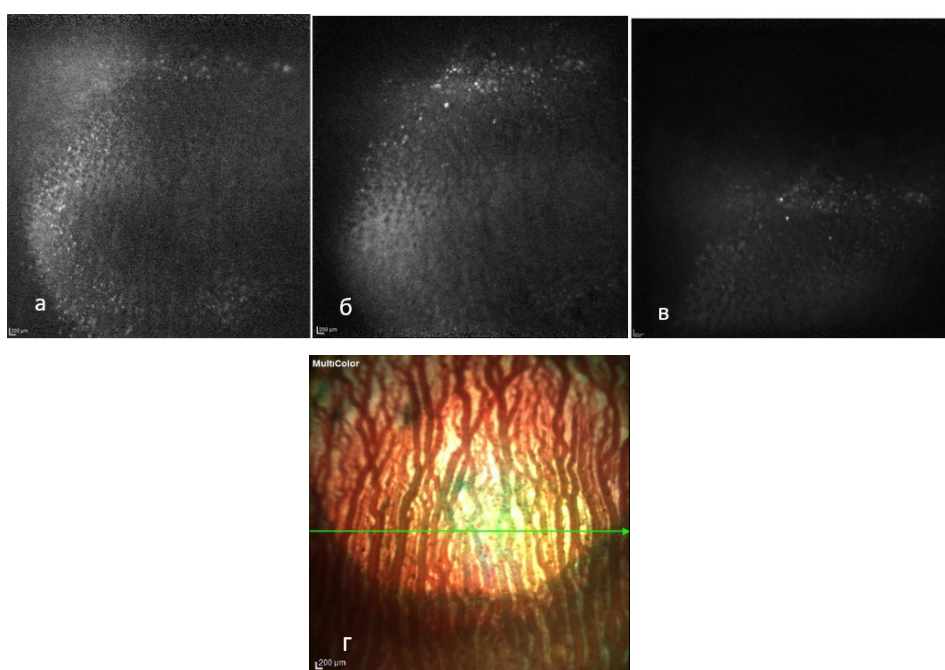


Рисунок 11. Исследование АФ и в режиме MultiColor, выполненное в разные сроки наблюдения при субретинальной трансплантации ИПСК-РПЭ животным Ia подгруппы: а) до трансплантации (атрофия РПЭ); б) на 14 сутки; в) на 28 сутки и более; г) визуализация области введения клеток в зону атрофии в режиме MultiColor.

Оценка результатов морфометрии выявила статистически достоверное уменьшение толщины сетчатки до проведения трансплантации суспензии в обеих подгруппах при сравнении с данными контроля ($p < 0,05$). Медиана толщины сетчатки в подгруппе Ia составила 95 мкм (диапазон значений составил от 85 до 110 мкм), во Ib подгруппе – 99 мкм (диапазон значений – от

87 до 115 мкм), тогда как в группе контроля медиана равнялась 150 мкм. В ходе анализа данных морфометрии сетчатки, полученных при проведении ОКТ, в группе животных-реципиентов с атрофией РПЭ на 14 сутки после трансплантации выявлено статистически значимое увеличение показателя толщины сетчатки: медиана составила 101,5 мкм в Па подгруппе и 103 мкм во Пб подгруппе ($p < 0,05$) и оставалась стабильной до окончания периода наблюдения (Таблица 4) [20].

Таблица 4. Показатели толщины сетчатки (мкм) в разные сроки наблюдения до и после трансплантации ИПСК-РПЭ в глаз с атрофией на фоне двух схем КИТ.

Сроки наблюдения (сутки)	Толщина сетчатки (мкм) в подгруппах (Me; Q1-Q3)		Контроль (n=6)
	Па - ЦсА (n=12)	Пб - ММФ (n=12)	
0 (до трансплантации)	95 * (85-110)	99 * (87-115)	150 (100-160)
14	101,5 • (80-115)	103 • (85-112)	
28	100 (80-113)	101 (83-110)	
60	100 (80-110)	100 (75-111)	

Примечание:

n - количество глаз;

*- достоверность отличия показателей при сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$);

• - достоверность отличия во второй группе на 14-е сутки по сравнению со значениями до трансплантации ($p < 0,05$).

Цветом обозначены статистически значимые отличия.

3.2.3 Оценка изменений биохимических показателей гепато- и нефротоксичности у животных-реципиентов на фоне двух схем комбинированной иммуносупрессивной терапии

Анализ данных стандартных и специализированных методов исследования, представленный выше, позволил заключить, что обе схемы КИТ, включающие в качестве системного компонента как ЦсА, так и ММФ, позволяют предупредить воспалительные осложнения в субретинальном пространстве и способствуют выживанию клеточного материала на всем периоде наблюдения.

Однако для дальнейшей трансляции метода в практическую клинику важно учитывать, что традиционно используемые в общей трансплантологии системные иммуносупрессивные средства профилактики болезни трансплантата при пересадках солидных органов, обладают широким спектром неблагоприятных эффектов, в частности, токсичностью в отношении почек и печени, могут привести к развитию артериальной гипертензии и пр. [79, 139, 140, 154].

В связи с этим, в данной работе проводили исследование и сравнительный анализ динамики основных лабораторных показателей нефро- и гепатотоксичности в СК животных-реципиентов, получавших ЦсА и ММФ в составе КИТ при трансплантации. Результаты представлены в таблице 5 и рисунках 12-15.

По данным биохимического анализа, на раннем и отдаленном периодах наблюдения резкое усиление активности АЛТ выявлено в крови животных после применения КИТ, включавшей в качестве системного компонента ЦсА - медиана показателя в данной группе составила 64 Ед/л и в 2 раза превышала таковые в группе с ММФ ($p < 0,05$) и контроля (тенденция) (Таблица 5).

Увеличение показателя АСТ на 14 и 60 сутки после трансплантации отмечали в обеих опытных группах по сравнению с контролем, однако

изменения активности фермента были ярче выраженными в группе животных-реципиентов, получавшей в составе КИТ ЦсА (102 Ед/л).

При исследовании содержания мочевины и креатинина также обнаружен рост их содержания в крови всех реципиентов, более высокие показатели метаболитов определяли в группе с применением ЦсА, в которой они имели тенденцию к дальнейшему увеличению (Таблица 5).

Таким образом, результаты сравнительного анализа позволяют сделать вывод о том, что более выраженной гепато- и нефротоксичностью обладает ЦсА.

По данным нашего исследования указанные неблагоприятные эффекты ЦсА отмечаются на раннем сроке и сохраняются далее на всем периоде наблюдения после трансплантации ИПСК-РПЭ.

Таблица 5. Сравнительная характеристика биохимических показателей гепато-и нефротоксичности у кроликов на фоне ЦсА и ММФ.

Показатель	Срок наблюдения	Группы	
		Me; Q1-Q3; min-max	
		Ia, Па-ЦсА (n=7)	Ib, Пб - ММФ (n=7)
АЛТ (Ед/л)	До лечения	24,8	
		29,6-52	
		24,8-84,2	
14 суток	64 [#]	31	
	27- 100 24-113,7	20,3-48,6 19,4-78,3	
60 суток	65 [*]	46,7	
	42,6-75,8 29,9-126,8	28,3-59,8 25,1-83,5	
АСТ (Ед/л)	До лечения	36,4	
		25,3-71	
		19,7-91,7	

	14 суток	102* 57-348 41,9- 413	62,7 29,8-189,9 26,7-233
	60 суток	85* 70-120 52-137	91* 83-112 78-161
Креатинин (μмоль/л)	До лечения	41 34-110,8 28,5-154,7	
	14 суток	83,9 67,6- 106,7 51,7- 147,7	66,5 47,2-78,7 33,5-110,5
	60 суток	114* 108,6-115,9 93,4-117,2	91,6 67,4-116,3 63,2-138,1
Мочевина (ммоль/л)	До лечения	7,95 6,7-9,25 5,4-10,9	
	14 суток	7,6 6,4-10,3 6,2-10,7	9,2 5,9-9,9 5,4-10,1
	60 суток	10,3* 8,9-10,6 7,6-12,2	9,2* 8,7-11,7 7,4-14,2

Примечание:

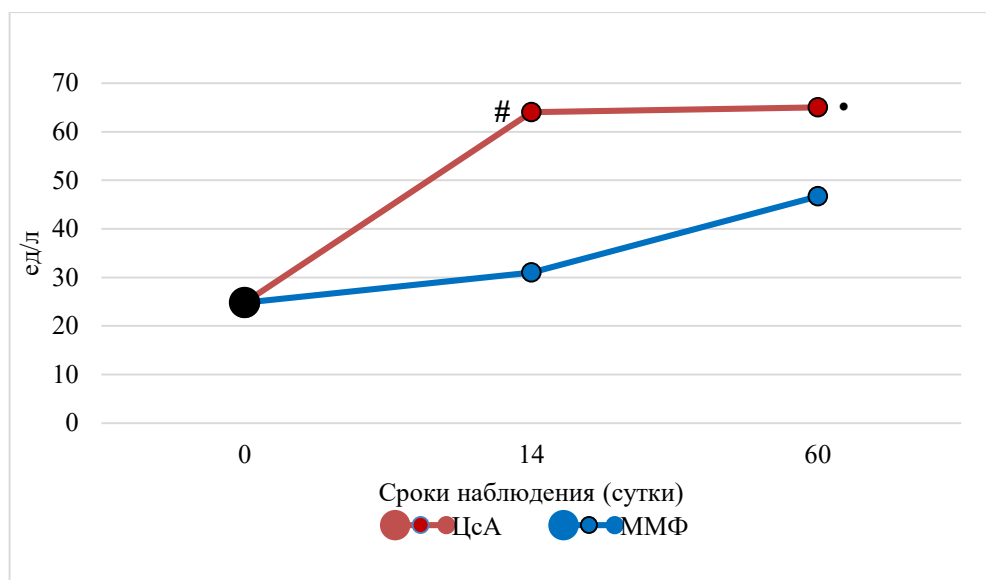
n - число экспериментальных животных;

* - достоверное отличие при сравнении показателей каждой из групп с контролем ($p < 0,05$);

• - тенденция к отличию показателей при сравнении с контролем;

- тенденция к отличию показателей при сравнении между основными группами.

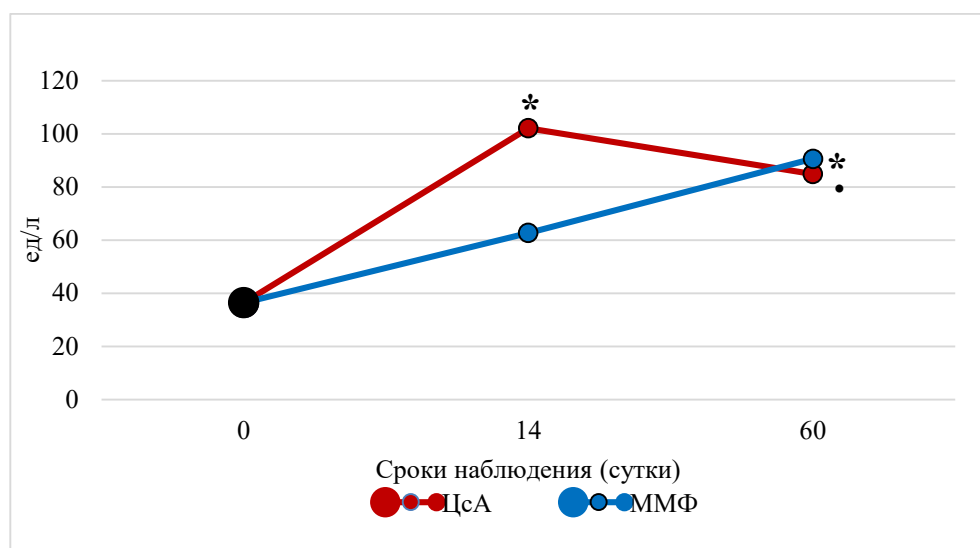
Цветом обозначены статистически значимые отличия.



Примечание:

- - тенденция к различию параметров при сравнении опытных групп с контролем;
- # - тенденция к различию параметров при сравнении опытных групп.

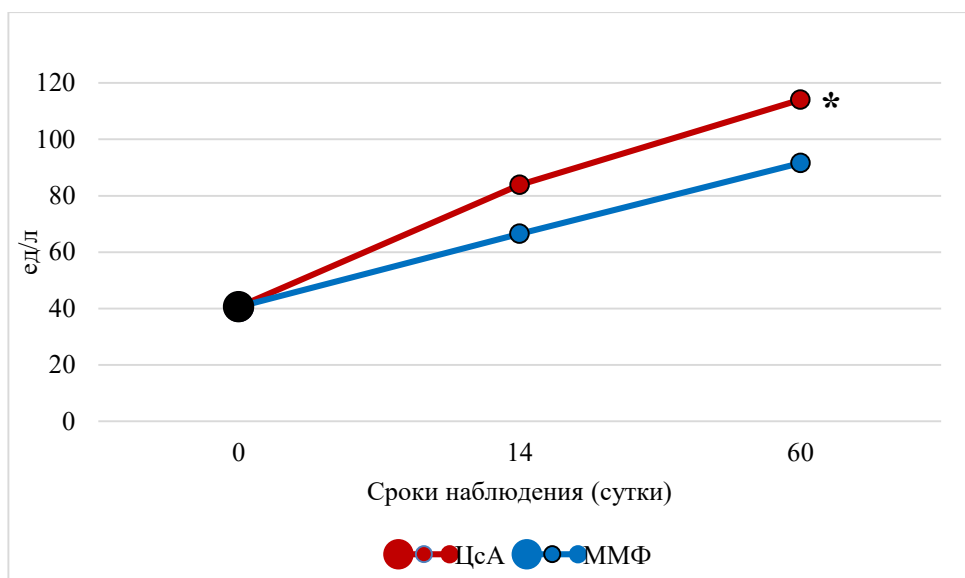
Рисунок 12. Изменения концентрации АЛТ в СК животных-реципиентов, получавших в качестве системного компонента КИТ ЦсА или ММФ, на сроках: до операции, на 14 и 60 сутки после ее окончания.



Примечание:

- * - достоверность отличия показателей при сравнении опытных групп с контролем ($p < 0,05$);
- - тенденция к различию параметров при сравнении опытных групп с контролем.

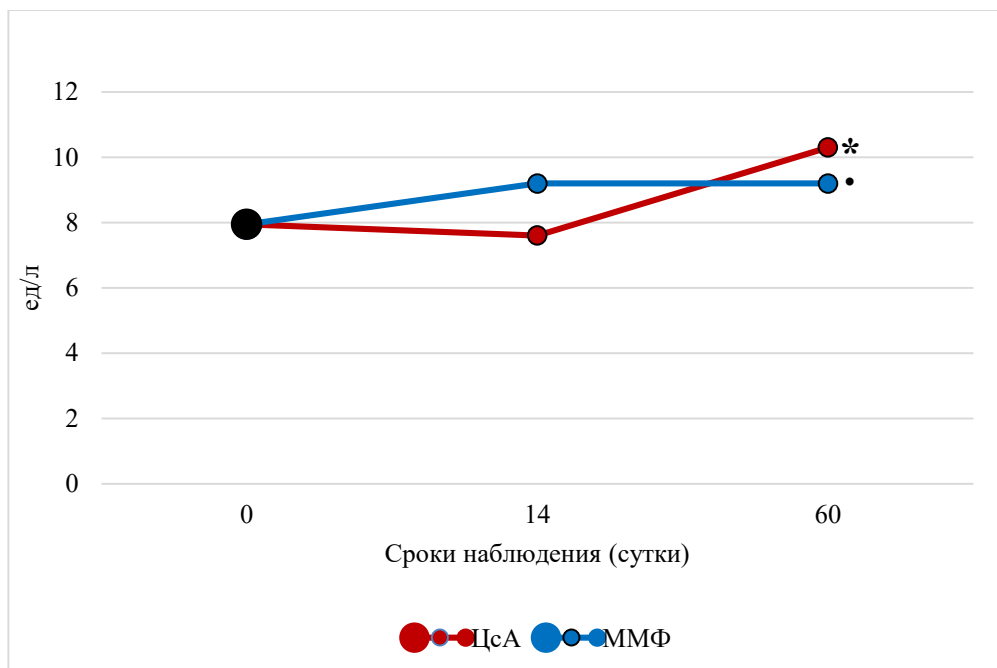
Рисунок 13. Изменения концентрации АСТ в СК животных-реципиентов, получавших в качестве системного компонента КИТ ЦсА или ММФ, на сроках до операции, на 14 и 60 сутки после ее окончания.



Примечание:

* - достоверность отличия показателей при сравнении опытных групп с контролем ($p < 0,05$).

Рисунок 14. Изменение уровня креатинина в СК животных-реципиентов, получавших в качестве системного компонента КИТ ЦсА или ММФ на сроках до операции, на 14 и 60 сутки после ее окончания.



Примечание:

* - достоверность отличия показателей при сравнении опытных групп с контролем ($p < 0,05$);

• - тенденция к различию параметров при сравнении опытных групп с контролем.

Рисунок 15. Изменение уровня мочевины в СК животных-реципиентов, получавших в качестве системного компонента КИТ ЦсА или ММФ, на сроках до операции, на 14 и 60 сутки после ее окончания.

3.3 Изучение динамики показателей локальной и системной продукции цитокинов иммунологического гомеостаза после трансплантации ИПСК-РПЭ в группах животных без офтальмопатологии и с моделью атрофии РПЭ на фоне двух схем комбинированной иммуносупрессивной терапии (КИТ) в эксперименте

3.3.1 Изучение и сравнительный анализ изменений уровней цитокинов иммунного ответа и факторов супрессии в стекловидном теле и сыворотке крови животных-реципиентов без офтальмопатологии, получавших ЦсА или ММФ в качестве системного компонента КИТ

Данный раздел работы посвящен анализу локальной и системной иммунологической реактивности кроликов-реципиентов с интактным РПЭ (I группа) на фоне двух схем КИТ, включающих в качестве системного иммуносупрессора ЦсА (подгруппа Ia) или ММФ (подгруппа Ib). Результаты исследования представлены в таблицах 6, 7 и на рисунках 16, 17, 18, 19.

В связи с тем, что при статистической обработке результатов и оценке данных клинико-иммунологического анализа индивидуально для каждой из подгрупп не обнаружено достоверных различий между параметрами, определенными на 28 и 60 сутки после трансплантации, нами проанализирован массив всех данных за весь указанный период (от 28 до 60 суток включительно), обозначенный в настоящей работе как «более \geq 28 сут.» (Таблицы 6, 7, 8, 9).

В раннем периоде (через 14 суток) после трансплантации в Ia подгруппе (КИТ с ЦсА) отмечали статистически значимое выраженное повышение интраокулярного синтеза TGF- β 1 (концентрация в СТ 43,9 пг/мл; размах значений 0 - 438 пг/мл) по сравнению с таковым в норме и Ib подгруппе (Таблица 6). Резкое увеличение локального уровня TGF- β 1 позволяет думать об индукции защитного противовоспалительного, репаративного ответа при введении клеточной суспензии ИПСК-РПЭ в здоровый глаз кроликов. К более поздним срокам в СТ животных-реципиентов, получавшим в составе КИТ ЦсА, отмечено снижение концентрации данного цитокина. Отсутствие

продукции TGF- β 1 в Ib подгруппе можно объяснить антипролиферативным эффектом микофенолата мофетила, который, по данным Yang P. и соавт., в умеренных количествах способен проникать через гематоретинальный барьер [129, 183] (Таблица 6, Рисунок 16).

Таблица 6. Изменение локальной продукции иммунорегуляторных и супрессивных факторов в разные сроки после трансплантации ИПСК-РПЭ в группах животных без офтальмопатологии, получавших ЦсА или ММФ в составе комбинированной иммуносупрессивной терапии.

Наименование показателя	До трансплантации	Подгруппы без офтальмопатологии (Me; Q1-Q3)			
		Ia Циклоспорин А (n=12)		Ib Микофенолат мофетил (n=12)	
		Сроки наблюдения после трансплантации			
		14 суток	Более 28	14 суток	Более 28
TGF- β 1 (пг/мл)	0 (0–0)	43,9* (0,0–438)	8,37* (0,1–19,06)	0,0• (0,0–0,0)	0,0# (0,0–182)
TGF- β 2 (пг/мл)	1237 (814–1496)	728 (539–889)	1192 (1161–1335)	1061 (467–2123)	1575 (707–2377)
TSP-1 (нг/мл)	1,2 (1,1–2,0)	1,5 (0,8–1,9)	2,2 (1,0–3,9)	12,9 (10,6–16,1)	12,3 (6,6–16,2)
IL-2 (пг/мл)	1,2 (0,0–10,2)	12,5 (6,3–16,7)	23,0* (6,9–78,4)	132 * • (23,4–400)	91,5 * (4,9–153)
IL-6 (пг/мл)	1,4 (1,3–1,7)	1,2 (1,1–3,5)	1,8 (1,5–2,0)	0,0 (0,0–1,5)	0,0 (0,0–1,9)

Примечание:

n - число глаз;

* - статистически значимые отличия показателей опытных подгрупп при сравнении с контролем ($p < 0,05$);

• - достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами Ia и Ib на 14 сутки после операции ($p < 0,05$);

- достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами Ia и Ib на 28 сутки и более после операции ($p < 0,05$).

Цветом обозначены статистически значимые отличия.

В обеих опытных подгруппах в раннем постоперационном периоде наблюдали похожие сдвиги в местной продукции TGF- β 2, выраженные более в подгруппе Ia: действительно, через 14 суток после трансплантации у животных-реципиентов, получавших ЦсА, уровень данного цитокина в СТ

находился на отметке 728 пг/мл, в это же время в группе с введением ММФ концентрация интраокулярного TGF- β 2 составляла 1061 пг/мл.

К 28-60 суткам после трансплантации в СТ всех опытных животных определено повышение содержания TGF- β 2 по сравнению с таковым на раннем сроке: медианы локальной продукции в подгруппах с приемом ЦсА достигли 1192 пг/мл и, соответственно, с введением ММФ - 1574 пг/мл (Таблица 6).

При анализе изменений интраокулярной продукции TSP-1 отмечали ее прогрессивное усиление на всех сроках наблюдения в обеих основных подгруппах, при этом в подгруппе Ia, где реципиенты получали в составе КИТ ЦсА, не проникающего через гематоретинальный барьер, можно заключить, что незначительное повышение концентрации данного протеина (однонаправленное с TGF- β 1) в СТ реципиентов является защитной реакцией на вводимые субретинально ксеногенные клетки.

В Ib подгруппе наблюдали схожую, но более выраженную динамику: учитывая способность ММФ в незначительных количествах проникать через ГРБ и оказывать прямое ингибирующее действие на TGF- β 1, можно предположить, что отсутствие синтеза указанного цитокина *in situ*, необходимого для реализации защитного ответа на трансплантированный материал, могло активировать компенсаторный подъем TSP-1, обладающего в т.ч. противовоспалительными свойствами, экспрессирующегося и реализующего свои биологические эффекты в зависимости от состояния микроокружения (Таблица 6). В более поздние сроки медиана интраокулярного TSP-1 в подгруппе с применением ЦсА составила 2,2 нг/мл, в подгруппе реципиентов, получавших в комплексе КИТ ММФ, находилась достигла 12,3 нг/мл (Таблица 6).

Анализ внутриглазного синтеза IL-2 показал существенное его увеличение у животных-реципиентов обеих подгрупп в раннем и отдаленном сроках после трансплантации. Через 14 суток после введения ИПСК-РПЭ у кроликов Ia подгруппы (ЦсА) концентрация в СТ указанного цитокина

достигла 12,5 пг/мл и продолжала увеличиваться к 28 суткам (23,0 пг/мл), усиление интраокулярной продукции IL-2 было статистически значимым по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (Таблица 6).

Следует отметить, что в СТ реципиентов, получавших ММФ в раннем и более позднем послетрансплантационном периодах определено более высокое содержание IL-2: его локальный уровень на 14 сутки после введения ИПСК-РПЭ находился на отметке 132 пг/мл и был значимо выше, чем таковой у животных-реципиентов подгруппы Ia ($p < 0,05$). К 28 и 60 суткам концентрация данного цитокина понизилась до 91,5 пг/мл, однако существенно превышала значение нормы (Таблица 6, рисунок 17).

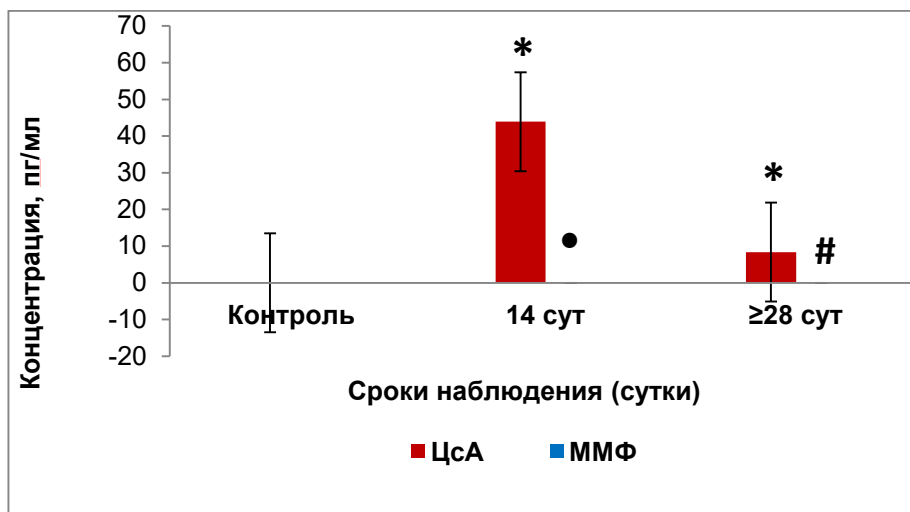
Такое выраженное усиление интраокулярной продукции IL-2 у кроликов обеих подгрупп может быть связано с активацией локального защитного механизма, обусловленного реакцией глиальных макрофагов на введенный в сетчатку материал ИПСК-РПЭ, поскольку, по мнению Girard S. и соавт., клетки микроглии способны продуцировать IL-2 в ответ на повреждающие факторы (ишемия и травма нервной ткани) в отсутствие Т-лимфоцитов [87].

Исследование интраокулярной продукции IL-6 при трансплантации ИПСК-РПЭ представилось необходимым в связи с имеющимися данными V. Enzmann и соавт. – первых исследователей, рекомендовавших определять данный цитокин в СТ с целью мониторинга местного воспалительного ответа и отторжения донорского материала при субретинальных трансплантациях в эксперименте [72].

Определение IL-6 в СТ также являлось важным, поскольку есть мнение ряда авторов, что его локальный синтез значительно повышается при инволюционных и дегенеративных изменениях сетчатки [190].

В нашем исследовании обнаружено, что уровень интраокулярной продукции IL-6 несколько повышался к поздним срокам наблюдения и достиг отметки 1,8 пг/мл в Ia подгруппе, и напротив, в подгруппе животных-реципиентов, получавших ММФ, данный цитокин определялся в единичных

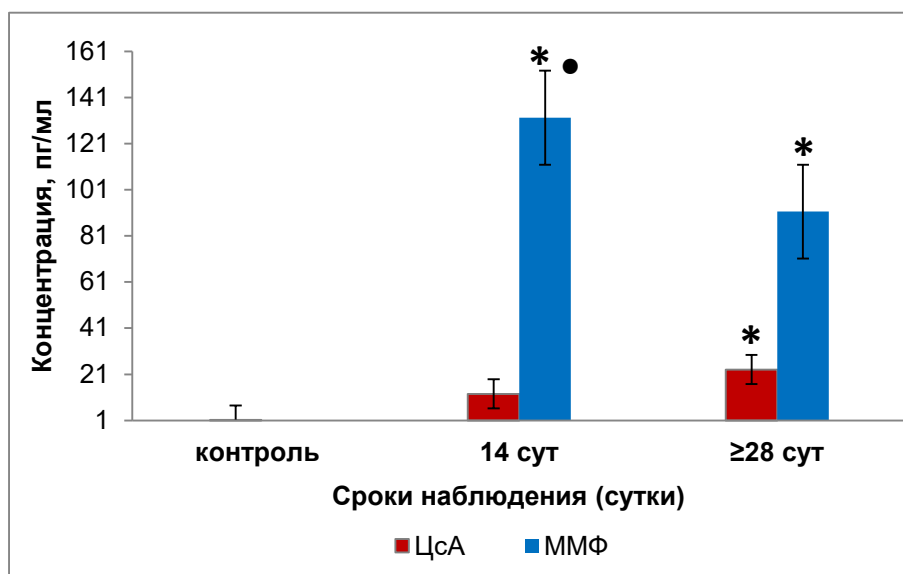
тест-пробах СТ. Эти результаты можно объяснить противовоспалительным действием триамцинолона ацетонида (кеналога) - местного компонента КИТ, вводимого всем животным интравитреально во время трансплантации ИПСК-РПЭ.



Примечание:

- * - статистически значимые отличия показателей опытных подгрупп при сравнении с контролем ($p < 0,05$);
- - достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами Ia и Ib на 14 сутки после операции ($p < 0,05$);
- # - достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами Ia и Ib на 28 сутки и более после операции ($p < 0,05$).

Рисунок 16. Изменение уровня TGF- β 1 в стекловидном теле животных-реципиентов без офтальмопатологии, получавших ЦсА или ММФ в составе комбинированной иммуносупрессивной терапии, в разные сроки после трансплантации ИПСК-РПЭ.



Примечание:

- * - статистически значимые отличия показателей опытных подгрупп при сравнении с контролем ($p < 0,05$);
- - достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами Ia и Ib на 14 сутки после операции ($p < 0,05$).

Рисунок 17. Изменение концентрации IL-2 в стекловидном теле животных-реципиентов без офтальмопатологии, получавших ЦсА или ММФ в составе комбинированной иммуносупрессивной терапии, в разные сроки после трансплантации ИПСК-РПЭ.

Результаты исследований системной продукции цитокинов представлены в таблице 7 и на рисунках 18, 19.

По данным таблицы 7 в раннем посттрансплантационном периоде в СК животных-реципиентов, получавших в составе КИТ Циклоспорин А (Ia подгруппа), определяли достоверное снижение содержания TGF- β 1 по сравнению с нормой, медиана показателя составила 282 пг/мл (размах значений в подгруппе 0,0 - 351 пг/мл) ($p < 0,05$). Более выраженное ослабление системной продукции TGF- β 1 наблюдали в Ib подгруппе, на фоне приема ММФ, где его уровень опустился до 69 пг/мл (диапазон значений от 0,0-215 пг/мл); статистически значимые отличия показателей выявлены как при сравнении с контролем, так и с подгруппой Ia ($p < 0,05$) (Таблица 7).

К 28-60 суткам после трансплантации на фоне приема ЦсА происходило восстановление сывороточной концентрации TGF- β 1 до

исходных значений (медиана - 430 пг/мл, минимальный уровень продукции - 423 пг/мл, максимальный - 479 пг/мл), тогда как в группе, получающей ММФ в составе КИТ наблюдали дальнейшее снижение системной продукции изучаемого цитокина (медиана - 42,6 пг/мл, диапазон - от 0,0 до 182 пг/мл) ($p < 0,05$) (Таблица 7, рисунок 18).

Анализ изменений концентраций TGF- β 2 в СК животных – реципиентов, получавших ЦсА и ММФ, не выявил изменений изучаемого параметра как относительно контроля, так и при сравнении основных подгрупп в раннем и отдаленном посттрансплантационном периодах (Таблица 7).

К 14 суткам после трансплантации в СК у животных подгруппы Ia обнаружен статистически значимый рост уровня TSP-1 по сравнению с показателем до операции ($p < 0,05$) (Таблица 7). В данной подгруппе медиана составила 10 нг/мл (при диапазоне значений от 8,3 до 16,1 нг/мл), что в 2 раза превышало значения нормы.

Напротив, в Ib подгруппе, получавшей в составе КИТ микофенолат мофетил, в этот период отмечали достоверное резко выраженное снижение сывороточного TSP-1 по сравнению с показателями животных в контроле и подгруппы Ia (Таблица 7, рисунок 19).

К более поздним срокам в СК животных обеих подгрупп содержание TSP-1 оставалось практически без изменений (Таблица 7).

В ходе исследования было установлено, что к 14 суткам после трансплантации IL-2 не определялся в большинстве тест-проб СК животных–реципиентов: этот цитокин был обнаружен лишь в единичных образцах биоматериала в подгруппе, получавшей ЦсА, где его медиана составила 6,07 пг/мл (снижение по сравнению с исходными значениями), и не был выявлен ни в одном случае в подгруппе Ib (Таблица 7).

К 28-60 суткам в подгруппе Ib в ряде проб СК IL-2 был обнаружен и в целом его медиана составила 6,3 пг/мл. В подгруппе Ia на этих же сроках изменений в продукции не происходило.

Таким образом, результаты исследования динамики концентрации ИЛ-2 на всем периоде наблюдения свидетельствуют о ее снижении в обеих опытных группах, что позволяет заключить, что применяемые схемы КИТ, с включением в качестве системной компоненты как ЦсА, так и ММФ, позволяют достигнуть системного иммуносупрессивного эффекта (Таблица 7).

Таблица 7. Изменение локальной продукции иммунорегуляторных и супрессивных факторов в разные сроки после трансплантации ИПСК- РПЭ в группах животных без офтальмопатологии, получавших ЦсА или ММФ в составе комбинированной иммуносупрессивной терапии.

Наименование показателя	Контроль	Подгруппы без офтальмопатологии (Me; Q1-Q3)			
		Ia Циклоспорин А (n=12)		Ib Микофенолат мофетил (n=12)	
		Период наблюдения			
		14 суток	Более 28	14 суток	Более 28
TGF-β1 (пг/мл)	469 (402– 584)	282* (0,0– 351)	430 (423–479)	69 • (0,0-216)	42,6 *# (0,0-183)
TGF-β2 (пг/мл)	1041 (427– 1143)	1147 (326–1320)	1115 (998– 1442)	1032 (576-1652)	1127 (493–1598)
TSP-1 (нг/мл)	5,2 (3,5– 6,8)	10* (8,3– 16,1)	10,3* (4,0 – 17,7)	0,7• (0,6-0,7)	0,7# (0,6-1,0)
ИЛ-2 (пг/мл)	10,5 (4,9– 16)	6,07 (0– 14)	0 (0,0– 14,2)	0,0 (0,0-0,0)	6,3 (0,0-78,4)
ИЛ-6 (пг/мл)	0,9 (0,9– 1,9)	1,5 (1,4 – 1,7)	1,3 (1,1 – 1,6)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-4,9)

Примечание:

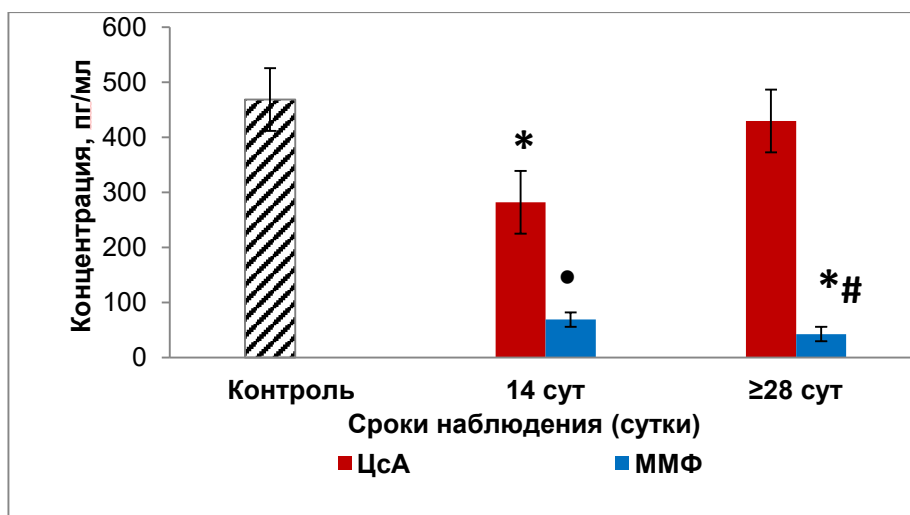
n - число глаз;

* - статистически значимые отличия показателей опытных подгрупп при сравнении с контролем ($p < 0,05$);

• - достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами Ia и Ib на 14 сутки после операции ($p < 0,05$);

- достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами Ia и Ib на 28 сутки и более после операции ($p < 0,05$).

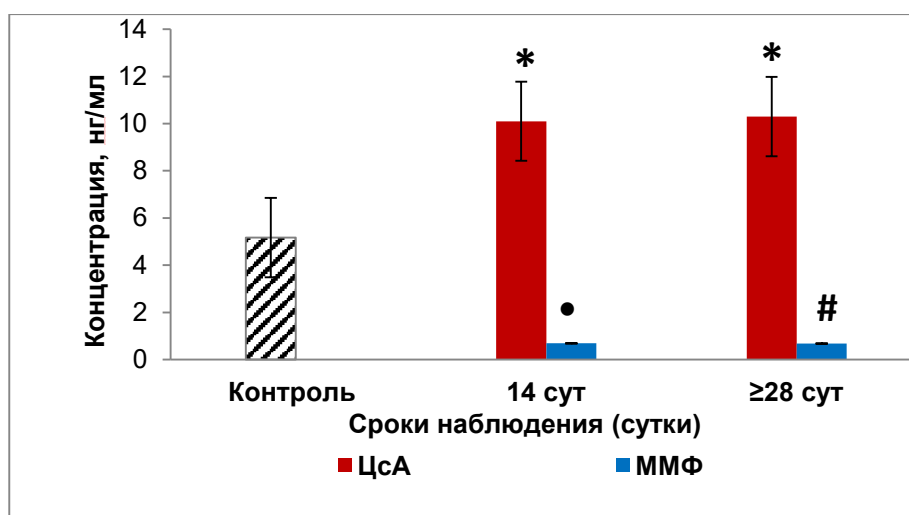
Цветом обозначены статистически значимые отличия.



Примечание:

- * - статистически значимые отличия показателей опытных подгрупп при сравнении с контролем ($p < 0,05$);
- - достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами Ia и Ib на 14 сутки после операции ($p < 0,05$);
- # - достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами Ia и Ib на 28 сутки и более после операции ($p < 0,05$).

Рисунок 18. Изменение уровня TGF- β 1 в сыворотке крови животных-реципиентов без офтальмопатологии, получавших в качестве системного компонента КИТ ЦсА или ММФ, в разные сроки после трансплантации ИПСК-РПЭ.



Примечание:

- * - статистически значимые отличия показателей опытных подгрупп при сравнении с контролем ($p < 0,05$);
- - достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами Ia и Ib на 14 сутки после операции ($p < 0,05$);
- # - достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами Ia и Ib на 28 сутки и более после операции ($p < 0,05$).

Рисунок 19. Изменение концентрации TSP-1 в сыворотке крови животных-реципиентов без офтальмопатологии, получавших в качестве системного компонента КИТ ЦсА или ММФ, в разные сроки после трансплантации ИПСК-РПЭ.

3.3.2 Сравнительный анализ изменений содержания супрессивных факторов и цитокинов иммунного ответа в стекловидном теле и сыворотке крови животных с атрофией ретинального пигментного эпителия при введении ИПСК–РПЭ на фоне двух схем КИТ.

Настоящий раздел работы включает анализ локальной и системной иммунологической реактивности кроликов-реципиентов с атрофией РПЭ (II-я группа) после трансплантации ИПСК-РПЭ на фоне двух схем КИТ, включающих в качестве системного иммуносупрессора ЦсА (IIa подгруппа) или ММФ (IIb подгруппа).

Результаты исследования представлены в таблицах 8, 9 и на рисунках 20, 21, 22.

При исследовании содержания TGF- β 1 в СТ животных–реципиентов установлено, что изучаемый фактор роста определялся в единичных тест-пробах основных подгрупп в раннем посттрансплантационном периоде – на 14 сутки; медиана TGF β 1 на этом сроке во IIa подгруппе составила 0,1 пг/мл, во IIb подгруппе – 0,0 пг/мл. В более позднем периоде уровни цитокина оставались практически на той же отметке (Таблица 8).

Отсутствие выраженной реакции на введенную субретинально суспензию ИПСК-РПЭ можно объяснить прямым действием ЦсА и ММФ, свободно проникающий через поврежденный в результате атрофии РПЭ гематоретинальный барьер.

TGF- β 2 обнаруживали в 100% проб СТ обеих подгрупп. У животных реципиентов до проведения трансплантации уровень синтеза TGF- β 2 достиг значений медианы 2195 пг/мл, что было достоверно выше, чем в подгруппах IIa и IIb на 14 сутки наблюдения, где концентрация снизилась до 729 и 902 пг/мл соответственно ($p < 0,05$). Более выраженное снижение продукции медиатора было зафиксировано на фоне приема ЦсА.

Таблица 8. Изменение уровней локальной продукции иммунорегуляторных и супрессивных факторов в разные сроки после трансплантации ИПСК- РПЭ у животных с атрофией РПЭ, получавших ЦсА или ММФ в качестве системного компонента комбинированной иммуносупрессивной терапии.

Наименование показателя	Животные с атрофией РПЭ (Ме; Q1-Q3)					Контроль (n=6)
	До трансплантации (n=6)	Па Циклоспорин А (n=12)		Пб Микофенолат мофетил (n=12)		
		Период наблюдения				
		14 суток	Более 28 суток	14 суток	Более 28 суток	
TGF-β1 (пг/мл)	0 (0-0)	0,1 (0,0 – 97)	0,079 (0,0 – 0,1)	0 (0-15)	0 (0-0)	0 (0– 0)
TGF-β2 (пг/мл)	2195 (1581-2809)	729* (642–1354)	1581 (627–2356)	902 * (701-1014)	1586 (721–2567)	1237 (814– 1496)
TSP-1 (нг/мл)	10 (8,4-11,7)	1,1* (0,9–3,0)	1,8 * (0,8–31,0)	10,3 • (6,7-13,2)	12,1 # (5,4-17,5)	1,2 (1,1– 2,1)
IL-2 (пг/мл)	13,7 (6,9– 19,3)	6,9 (0,5 – 26,1)	0,0 * (0,0 – 3,8)	1,8 *• (0,0– 6,7)	7,6*# (0 – 67,6)	1,2 (0– 10,2)
IL-6 (пг/мл)	0 (0– 2)	1,4 (1,3 – 2)	1,49 (2– 1,4)	0 (0-1,5)	0 (0-1,1)	1,4 (1,3– 1,71)

Примечание:

n - число глаз;

* - статистически значимые отличия показателей опытных подгрупп при сравнении с группой до трансплантации ($p < 0,05$);

• - достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами а и b на 14 сутки после операции ($p < 0,05$);

- достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами а и b на 28 сутки и более после операции ($p < 0,05$).

Цветом обозначены статистически значимые отличия.

Известно, что TGF-β2 является основным супрессивным компонентом интраокулярных сред; в нашем исследовании снижение его концентрации в СТ животных Па и Пб подгрупп на ранних сроках после трансплантации скорее всего свидетельствует о включении защитных механизмов, реализуемых в условиях атрофии на введение ксеногенного материала в СРП.

Следует отметить, что к более поздним срокам уровень TGF- β 2 в опытных глазах реципиентов повысился и достиг диапазона нормальных значений, что в целом свидетельствовало об адекватно подобранной схеме иммуносупрессивной терапии (Таблица 8, рисунок 20).

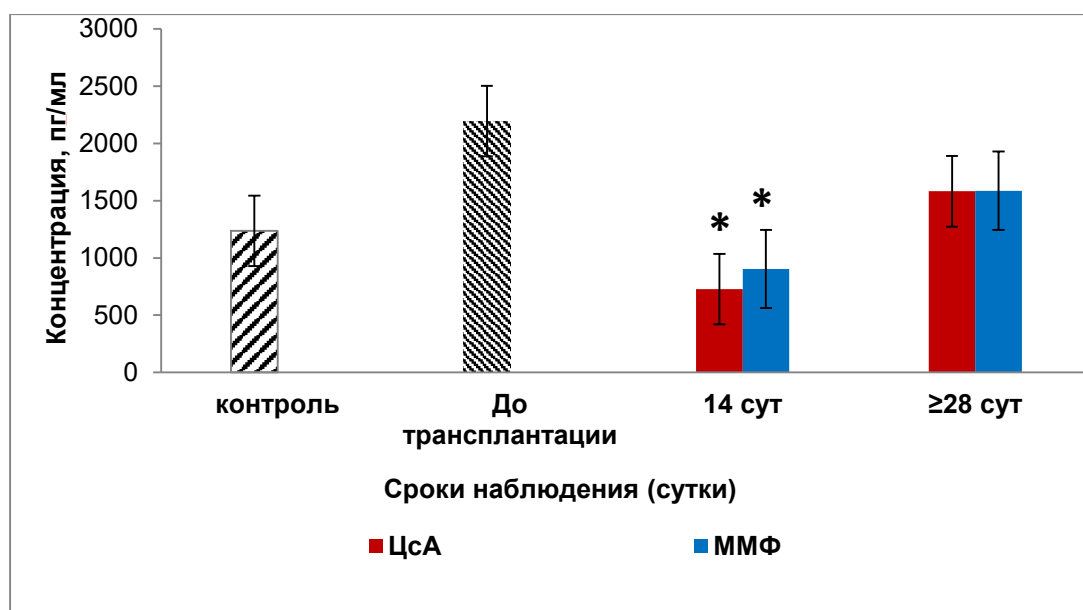
На всех контрольных сроках посттрансплантационного периода в СТ животных Па подгруппы (ММФ) выявлено статистически значимое снижение TSP-1 по сравнению с исходно высокими значениями до операции и таковыми у Пб подгруппы, где данный показатель не был подвержен каким-либо изменениям (Таблица 8, рисунок 21).

При исследовании IL-2 выявлено достоверное ослабление его локальной продукции в обеих опытных подгруппах: через 14 суток после трансплантации концентрация указанного цитокина в СТ животных-реципиентов Па подгруппы (получавших ЦсА) составила 6,9 пг/мл, во Па подгруппе (с ММФ) - 1,8 пг/мл.

На отдаленных сроках наблюдали обратную динамику, которая характеризовалась снижением локального уровня у реципиентов, получавших ЦсА и повышением содержания данного цитокина в СТ во Пб подгруппе (Таблица 8, Рисунок 22).

Полученные данные позволяют думать, что интраокулярная динамика IL-2 в большей мере была обусловлена действием изучаемых системных иммуносупрессоров (ЦсА и ММФ), способных беспрепятственно проникать через поврежденный при атрофии ГРБ.

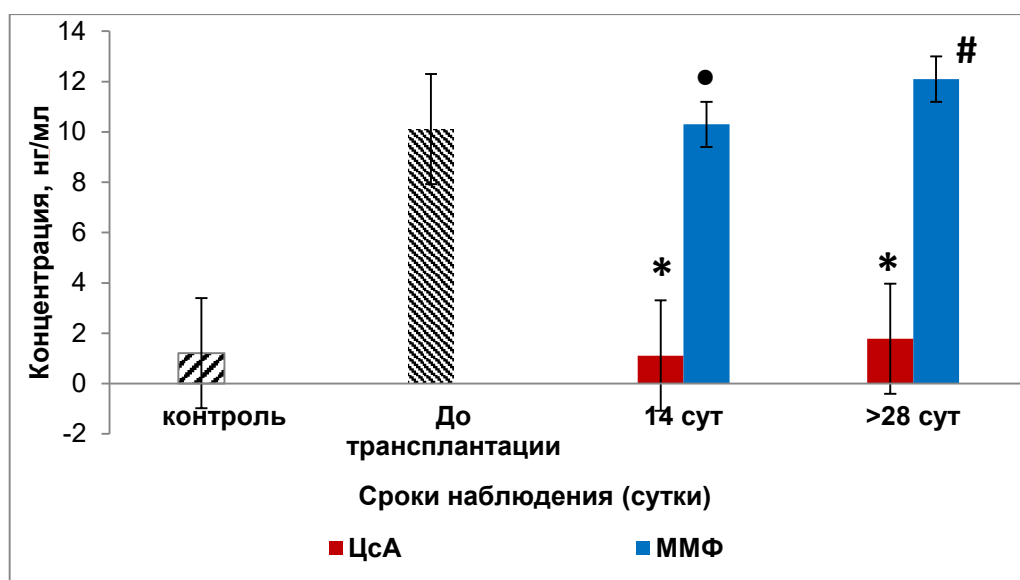
Уровень локальной продукции IL-6 на всем периоде наблюдения в обеих опытных подгруппах оставался без существенных изменений (Таблица 8).



Примечание:

* - статистически значимые отличия показателей опытных подгрупп при сравнении с группой до трансплантации ($p < 0,05$).

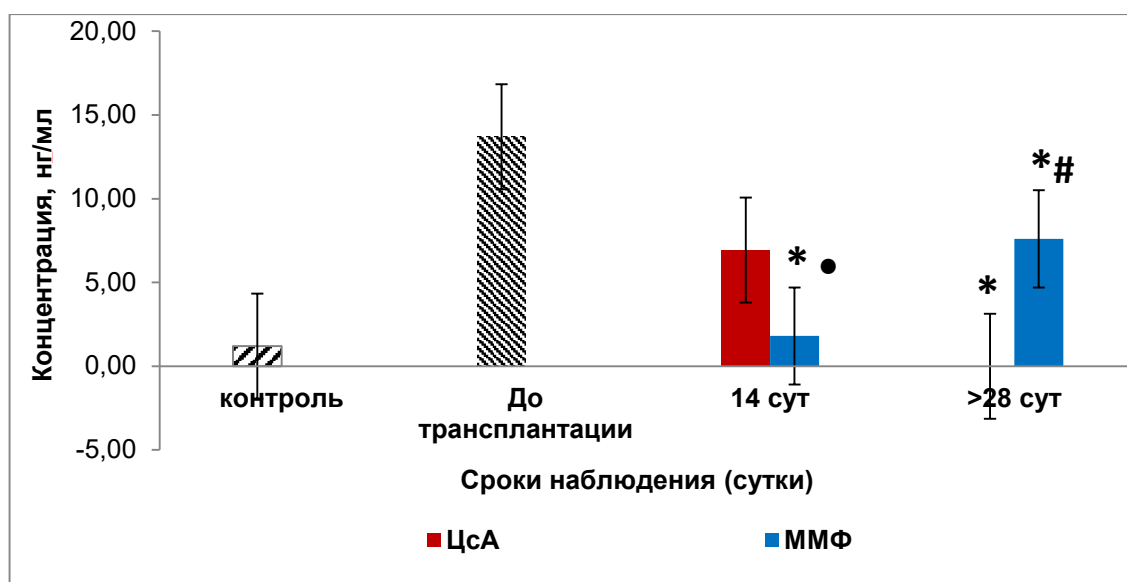
Рисунок 20. Изменение концентраций TGF-β2 в стекловидном теле животных-реципиентов с атрофией РПЭ, получавших в качестве системного компонента КИТ ЦсА или ММФ, в разные сроки после трансплантации.



Примечание:

- * - статистически значимые отличия показателей опытных подгрупп при сравнении с группой до трансплантации ($p < 0,05$);
- - достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами а и в на 14 сутки после операции ($p < 0,05$);
- # - достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами а и в на 28 сутки и более после операции ($p < 0,05$).

Рисунок 21. Изменение содержания TSP-1 в стекловидном теле животных-реципиентов с атрофией РПЭ, получавших в качестве системного компонента КИТ ЦсА или ММФ, в разные сроки после трансплантации.



Примечание:

- * - статистически значимые отличия показателей опытных подгрупп при сравнении с группой до трансплантации ($p < 0,05$);
- - достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами а и б на 14 сутки после операции ($p < 0,05$);
- # - достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами а и б на 28 сутки и более после операции ($p < 0,05$).

Рисунок 22. Изменение концентрации IL-2 в стекловидном теле животных-реципиентов с атрофией РПЭ, получавших в качестве системного компонента КИТ ЦсА или ММФ, в разные сроки после трансплантации.

Результаты исследования системной продукции вышеуказанных цитокинов после трансплантации ИПСК-РПЭ животным с атрофией РПЭ на фоне двух режимов комбинированной иммуносупрессивной терапии приведены в таблице 9.

При изучении динамики TGF- β 1 обнаружено увеличение его системной продукции в раннем посттрансплантационном периоде, более выраженное во IIa подгруппе: медиана показателя составила 729 пг/мл и достоверно превышала таковую на дооперационном этапе и в норме (Таблица 9).

В более поздние сроки содержание TGF- β 1 в СК снижалось: ослабление системной продукции наблюдали на фоне применения ММФ в

составе КИТ: сывороточный уровень этого цитокина достиг 98 пг/мл ($p < 0,05$) (Таблица 9, рисунок 23).

Таблица 9. Изменение уровней системной продукции иммунорегуляторных и супрессивных факторов в разные сроки после трансплантации ИПСК- РПЭ у животных с атрофией РПЭ, получавших ЦсА или ММФ в качестве системного компонента комбинированной иммуносупрессивной терапии.

Наименование показателя	До трансплантации (n=6)	Животные с атрофией РПЭ (Ме; Q1-Q3)				Контроль (n=6)
		Па Циклоспорин А (n=12)		Пб Микофенолат мофетил (n=12)		
		Период наблюдения				
		14 суток	Более 28 суток	14 суток	Более 28 суток	
TGF-β1 (пг/мл)	147 (124–168)	729* (479-766)	290 (0,9–599)	191• (177-407)	98*# (0 – 158)	469 (402–584)
TGF-β2 (пг/мл)	1243 (1125-1359)	1378** (1362–1505)	1215** (670–2112)	857• (755-1108)	543*# (0,7–1169)	1041 (427–1143)
TSP-1 (нг/мл)	0,9 (0,6-1,3)	8,3* (6,6 – 11,9)	8,2* (5,2–30,9)	2,0• (1,6-2,9)	1,2# (0,6-1,4)	5,2 (3,5–6,8)
IL-2 (пг/мл)	0 (0-0)	0 (0–18,7)	0 (0–24,7)	0 (0-0)	0 (0-0)	10,5 (4,9–16,0)
IL-6 (пг/мл)	0 (0-3,2)	1,5 (1,1 – 1,5)	1,2 (0,9 – 1,4)	0 (0-1,2)	0 (0-0)	0,9 (0,9–1,9)

Примечание:

n - число глаз;

* - статистически значимые отличия показателей опытных подгрупп при сравнении с группой до трансплантации ($p < 0,05$);

** - статистически значимые отличия показателей опытных подгрупп при сравнении с контролем ($p < 0,05$).

• - достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами а и б на 14 сутки после операции ($p < 0,05$);

- достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами а и б на 28 сутки и более после операции ($p < 0,05$).

Цветом обозначены статистически значимые отличия.

Анализ сывороточных концентраций TGF-β1 у кроликов с пересадкой ИПСК-РПЭ в глаз атрофичным РПЭ показал снижение концентрации TGF-β1 в крови животных - моделей до трансплантации, а также в поздние сроки наблюдения в подгруппе, получающей ЦсА и на всем периоде наблюдения в

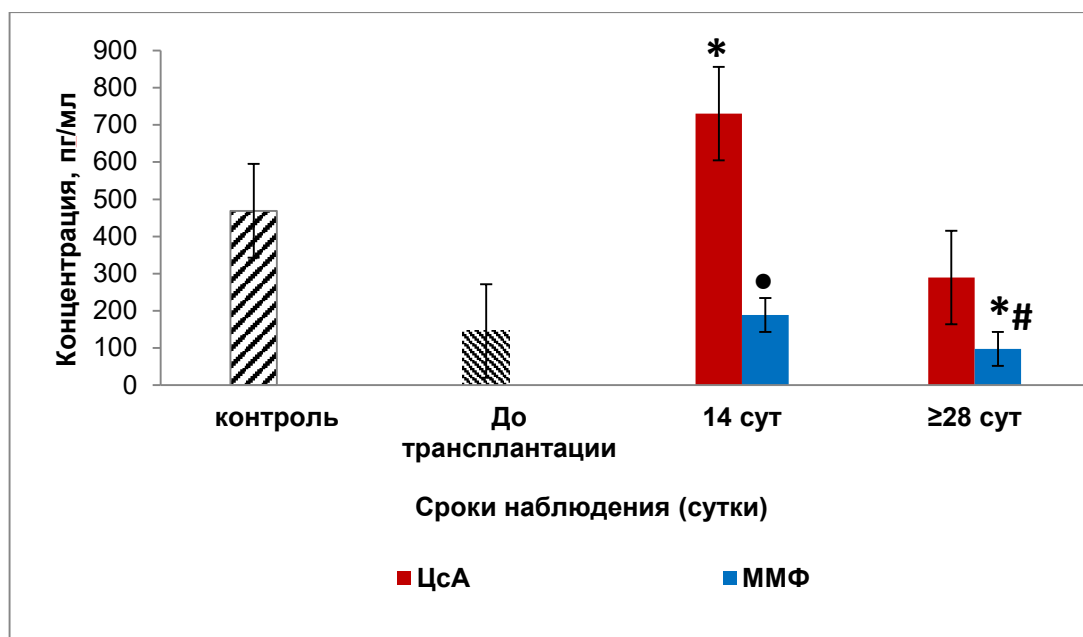
подгруппе с использованием ММФ. Такое снижение цитокина свидетельствует о нарушении механизма системной иммунологической толерантности, вызванного атрофией РПЭ.

Интересные результаты были получены при анализе системной продукции TGF- β 2: так во Па подгруппе определено ее усиление на протяжении всего периода наблюдения относительно нормы ($p < 0,05$), тогда как в СК животных Пб подгруппы обнаружено достоверное снижение содержания цитокина ($p < 0,05$), свидетельствует о более выраженном системном иммуносупрессивном эффекте ММФ (Таблица 9, рисунок 24).

На 14 сутки после проведения трансплантации уровень TSP-1 в СК обеих подгрупп повышался по сравнению с исходными значениями, более выраженная динамика отмечена во Па подгруппе, где значение показателя составило 8,3 нг/мл, тогда как подгруппе Пб концентрация цитокина увеличилась до 2,0 нг/мл. В более позднем периоде (на 28-60 сутки) во Па подгруппе секреция TSP-1 оставалась без изменений. В целом эти результаты также свидетельствовали о более выраженном системном супрессивном влиянии ММФ (Таблица 9, Рисунок 25).

IL-2 в подавляющем большинстве проб СК животных–реципиентов обеих подгрупп отсутствовал: лишь в единичных случаях данный цитокин обнаруживали в концентрациях, несущественно превышающих таковые в норме, что свидетельствовало о прямом иммуносупрессивном действии ЦсА и ММФ. В группе ММФ ни в одной из тест-проб СК не был обнаружен IL-2 (Таблица 9).

IL-6 в СК животных-реципиентов не претерпевал значимых изменений ни в одной из исследуемых групп: медиана показателя до трансплантации составила 0,0 пг/мл (интервал от 0,0 до 3,2 пг/мл), на 14 и 28-60 сутки во Пб в тест–пробах цитокин не обнаруживали (Таблица 9).



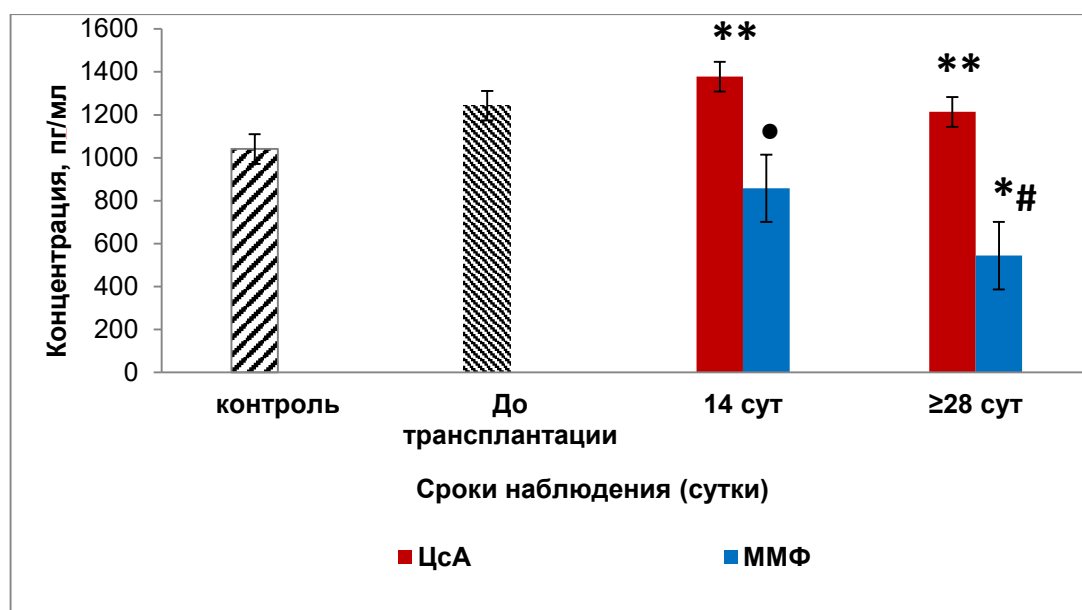
Примечание:

* - статистически значимые отличия показателей опытных подгрупп при сравнении с группой до трансплантации ($p < 0,05$);

• - достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами а и б на 14 сутки после операции ($p < 0,05$);

- достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами а и б на 28 сутки и более после операции ($p < 0,05$).

Рисунок 23. Изменение уровня TGF- β 1 в сыворотке крови животных-реципиентов с атрофией РПЭ, получавших в качестве системного компонента КИТ ЦсА или ММФ, в разные сроки после трансплантации.



Примечание:

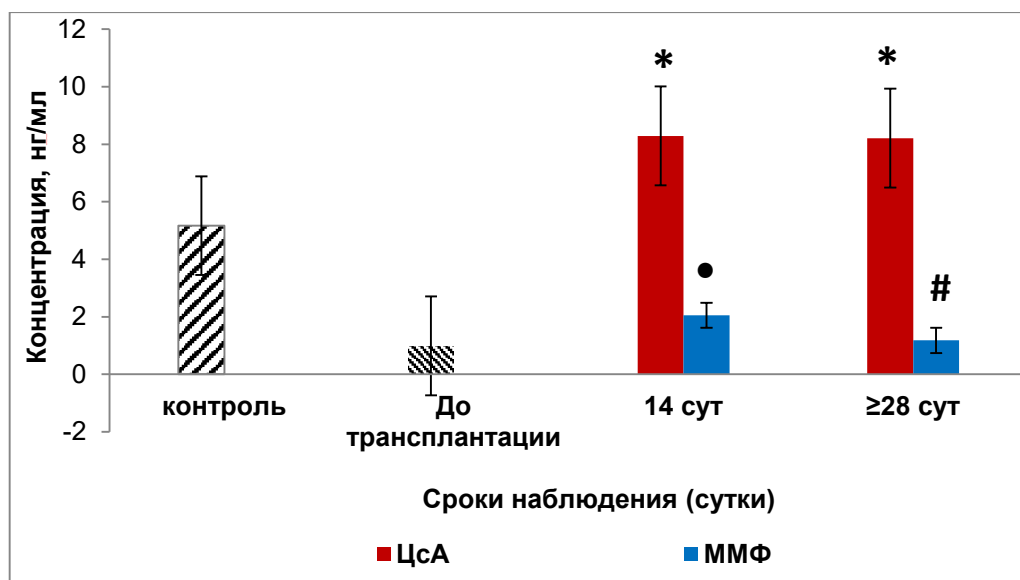
* - статистически значимые отличия показателей опытных подгрупп при сравнении с группой до трансплантации ($p < 0,05$);

** - статистически значимые отличия показателей опытных подгрупп при сравнении с контролем ($p < 0,05$).

• - достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами а и б на 14 сутки после операции ($p < 0,05$);

- достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами а и б на 28 сутки и более после операции ($p < 0,05$).

Рисунок 24. Изменение содержания TGF- β 2 в сыворотке крови животных-реципиентов с атрофией РПЭ, получавших в качестве системного компонента КИТ ЦсА или ММФ, в разные сроки после трансплантации.



Примечание:

- * - статистически значимые отличия показателей опытных подгрупп при сравнении с группой до трансплантации ($p < 0,05$);
- - достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами а и б на 14 сутки после операции ($p < 0,05$);
- # - достоверность отличий показателей при сравнении между подгруппами а и б на 28 сутки и более после операции ($p < 0,05$).

Рисунок 25. Изменение уровня TSP-1 в сыворотке крови животных-реципиентов с атрофией РПЭ, получавших в качестве системного компонента КИТ ЦсА или ММФ, в разные сроки после трансплантации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прогрессирующее поражение РПЭ лежит в основе патогенеза дегенеративно-дистрофических заболеваний сетчатки, к ним относятся: ВМД, болезнь Штаргардта, пигментный ретинит, болезнь Беста и пр. Во главе с ВМД эти заболевания могут приводить к необратимой потере центрального зрения и даже к слепоте и инвалидности [85].

По данным Wong W.L., в связи с увеличением продолжительности жизни, количество пациентов с данной патологией будет неуклонно расти [179]. При этом возможности лечения на поздних стадиях ВМД ограничены. Для борьбы с ХНВ при «влажной» форме ВМД существуют антиангиогенные препараты, однако для ГА эффективных способов лечения не разработано, так как РПЭ неспособен к регенерации [80].

Наиболее многообещающим подходом для замены поврежденного РПЭ является субретинальная трансплантация клеток РПЭ производных от ИПСК-РПЭ [166].

Возможность относительно безопасной трансплантации в субретинальное пространство определяется наличием иммунной привилегии глаза, а также сами ИПСК-РПЭ обладают противовоспалительными свойствами [166, 189].

Однако, несмотря на уникальную иммуносупрессивную среду в СРП, трансплантация ксеногенных СК в условиях отсутствия иммуносупрессии приводит к тяжелому воспалению и отторжению трансплантата в эксперименте [123, 150].

Необходимо отметить, что к срыву иммунной привилегии и ослаблению иммунологической толерантности в СРП могут приводить такие факторы как травма, вызванная хирургическим вмешательством, воспалительные, дегенеративные, дистрофические процессы, действие УФ, накопление токсических веществ. Все эти негативные факторы вызывают и поддерживают продукцию ряда медиаторов, ответственных за индукцию

хемотаксиса клеток воспаления, развитие иммунного ответа, аномальный фиброгенез и другие патологические изменения [17, 25, 164].

В литературе с целью улучшения выживаемости трансплантата РПЭ в СРП в эксперименте наиболее часто используют кортикостероиды и циклоспорин А [99, 108].

Согласно анализу литературных данных, применение указанных средств в качестве монотерапии в большинстве случаев не способствует увеличению выживаемости трансплантированного клеточного материала, даже при пересадке в глаз с интактным РПЭ. Более того, длительные курсы стероидов могут приводить к появлению и прогрессированию катаракты, а также офтальмогипертензии и глаукоме [99, 108].

Одним из способов нивелирования проблемы тканевой несовместимости может стать комбинированная иммуносупрессивная терапия (КИТ), направленная, с одной стороны, на подавление интраокулярного воспаления (в СРП), а с другой – системного трансплантационного иммунного ответа.

Fujii S. и соавт. представили доказательства безопасности субретинальной трансплантации ИПСК-РПЭ у приматов на фоне КИТ, включающей КС и ЦсА. В результате применения данной схемы терапии наблюдали длительное выживание ксеногенного материала в СРП [83].

В то же время ЦсА связан с развитием широкого спектра неблагоприятных реакций и побочных эффектов у пожилых пациентов, включая развитие гепато- и нефротоксичности, а также повышенные риски образования опухолей [140].

В этой связи, перспективным представляется использование иммунодепрессанта метаболического типа с менее выраженными побочными эффектами - микофенолата мофетил (ММФ). ММФ – предшественник активной субстанции микофеноловой кислоты; как и ЦсА, селективно подавляет пролиферацию Т-лимфоцитов, но в отличие от последнего обладает более широкой иммуносупрессивной активностью, демонстрирует

антипролиферативные, нейропротективные и антиангиогенные свойства [129, 183].

Данный препарат уже показал свою эффективность в общей трансплантологии, а также при пересадках роговицы [47]. В работе Birnbaum F. и соавт. проводили кератопластику высокого риска, где часть пациентов получала системный ММФ, а другая часть – ЦсА. Частота прозрачного приживления была значительно выше в группе, где проводили пересадку на фоне ММФ [46].

Также в литературе имеются данные об успешном применении ММФ при лечении таких воспалительных заболеваний глаз, как увеиты, склериты [192].

В современной литературе отсутствуют данные о применении ММФ в качестве иммуносупрессии в эксперименте при проведении трансплантации РПЭ, несмотря на теоретически ожидаемую эффективность.

Последние несколько лет в ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» совместно с ФГБУ «ФНКЦ ФХМ ФМБА России» проводят экспериментальные исследования по субретинальной трансплантации ИПСК-РПЭ. В недавнем исследовании Уткиной О.А. «Эффективность трансплантации ретинального пигментного эпителия на экспериментальной модели его атрофии» проведено сравнение между двумя способами доставки клеточного материала, выяснилось, что трансплантация монослоя клеток на искусственной мембране чаще приводит к интра- и послеоперационным осложнениям, в связи с более сложной хирургической техникой, что позволило считать введение в виде суспензии более перспективным методом [33]. Однако целенаправленные исследования локальной (на уровне глаза) и системной (на уровне организма) иммунологической реактивности, а также оценка эффективности комбинированных иммуносупрессорных средств при пересадках стволовых клеток РПЭ в моделях дегенерации сетчатки практически отсутствуют.

Цель работы: комплексное клинико-иммунологическое исследование эффективности и безопасности трансплантации суспензии ИПСК-РПЭ при разных режимах комбинированной иммуносупрессивной терапии в эксперименте на кроликах.

Эксперимент проводили на 54 кроликах породы Новозеландский альбинос. Животные были разделены на 2 группы, I группе (24 кролика) проводили субретинальная трансплантация ИПСК-РПЭ в глаз с интактным РПЭ. II группе (24 кролика) предварительно была создана атрофия РПЭ по ранее разработанной методике в ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца», после чего через месяц после моделирования проводили субретинальная трансплантация ИПСК-РПЭ в виде суспензии. Все животные-реципиенты получали КИТ, которая включала однократное интравитреальное интраоперационное введение триамцинолона ацетонида и ежедневный пероральный прием селективного иммуносупрессора до окончания исследований. В зависимости от состава КИТ, две основные группы распределили на две подгруппы: Ia и IIa подгруппы (n=24) получали в качестве системной составляющей ЦсА в дозе 10 мг/кг 1 раз в сутки, в Ib и IIb подгруппах (n=24) применялся ММФ в дозе 50 мг 1 раз в сутки. Группу контроля составили 6 соматически здоровых экспериментальных животных без патологии глаз.

Функциональные клетки РПЭ человека были произведены путем направленной дифференцировки ИПСК, ранее полученных из фибробластов здорового донора в лаборатории клеточной биологии ФГБУ «ФНКЦ ФХМ ФМБА» России и хранящихся в клеточном банке лаборатории (директор – чл.-корр. РАН, д.б.н. Лагарькова М.А.).

Предоперационная подготовка животных заключалась во введении обезболивающих препаратов; перед хирургическим вмешательством вводили 0,3 мл 0,4% раствора дексаметазона, 0,5 мл этамзилата для снижения риска развития экссудативно-геморрагических осложнений. Введение ИПСК-РПЭ осуществляли в правый глаз доступом parsplana с установкой портов 23 Ga с

помощью ретиномии на расстоянии 0,5 pd книзу от диска зрительного нерва в количестве 50000 клеток, суспендированных в 0,05 мл фосфатно-солевого буферного раствора («ПанЭко», Россия).

Оценку результатов трансплантации выполняли с помощью стандартных и специализированных офтальмологических методов: биомикроскопии, оптической когерентной томографии (ОКТ), аутофлюоресценции (АФ) в режиме MultiColor, фоторегистрации глазного дна (Heidelberg Spectralis™ SD-OCT, Германия). Исследования проводили на ранних (14 суток) и отдаленных сроках (28-60 суток) после хирургического вмешательства. При проведении ОКТ толщину сетчатки измеряли в области зрительной полоски – аналог макулярной области у человека, за норму были приняты значения толщины сетчатки до проведения оперативного лечения, которые варьировались в диапазоне 140–160 мкм. В указанные сроки наблюдений производили забор крови (из ушной вены с помощью стерильных вакуумных систем), после которого животные были выведены из эксперимента методом воздушной эмболии после погружения в наркоз, после введения в наркоз проводили энуклеацию (Приказ Минвуза СССР № 724 от 13.11.1984).

Иммунологические исследования выполнены в 54 образцах стекловидного тела (СТ), выделенного в объеме не менее 1,5 мл из энуклеированных глаз, и 54 пробах сыворотки крови (СК) кроликов опытных и контрольной групп.

В образцах стекловидного тела (СТ) и сыворотки крови (СК) методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческих тест-систем определяли содержание TGF-β1, TGF-β2, TSP-1, IL-2, IL-6 согласно инструкциям производителей.

При анализе результатов биомикроскопии и офтальмоскопии на ранних и отдаленных сроках после трансплантации у кроликов обеих опытных групп не было выявлено признаков воспаления в переднем и заднем отрезках глаза. В эти же сроки наблюдения не визуализировали патологических

изменений на глазном дне (не отмечено случаев отслойки сетчатки, образования шварт, кровоизлияний, экссудатов, побледнений сетчатки, патологических очагов и др.).

Не было выявлено отличий между показателями толщины сетчатки в группе контроля 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 году [65, 191].

При проведении ОКТ у кроликов с трансплантацией в здоровый глаз (I группа) на фоне двух схем КИТ на 14 сутки профиль сетчатки не был изменен, все ее слои дифференцировались, под нейросенсорной сетчаткой визуализировали зона умеренной гиперрефлективности, которая соответствовала месту трансплантированных клеток. К 28 суткам наблюдения и далее к 60 суткам отмечали более ровную гиперрефлективность монослоя под нейросенсорной сетчаткой, позволяющая говорить о распределении субретинально введенного клеточного материала и «стремлении» РПЭ к «правильной» ориентации в виде монослоя клеток. В эти же сроки, по данным ОКТ, профиль и структура сетчатки оставались неизменными. Данные аутофлюоресценции свидетельствовали о перераспределении клеточной суспензии в субретинальном пространстве с тенденцией к организации в виде монослоя в обеих подгруппах.

Во II опытной группе до трансплантации, по данным ОКТ, обнаруживали область повышенного проникновения сканирующего луча в подлежащие ткани, свидетельствующая о формировании атрофии РПЭ.

На 14 сутки после субретинального введения суспензии ИПСК-РПЭ на фоне приема иммуносупрессантов в группе с атрофией РПЭ, профиль сетчатки сохранен, слои сетчатки дифференцированы, на срезах не выявлено ОКТ-признаков воспалительных и других патологических изменений сетчатки. В позднем периоде наблюдения (28–60 сутки) отмечается частичное уменьшение прохождения сканирующего луча под сетчатку и, как следствие,

уменьшение гиперрефлексивности хориоидеи, что может указывать на частичное восстановление клеток РПЭ. Осложнений и отрицательной динамики выявлено не было. В ходе анализа данных морфометрии сетчатки, полученных при проведении ОКТ, в группе животных-реципиентов с атрофией РПЭ на 14 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. При анализе данных аутофлюоресценции у животных Па и Пб подгруппы на фоне двух режимов иммуносупрессии отмечали тенденцию к выравниванию аутофлюоресценции и уменьшению количества мелких точечных фокусов гиперфлюоресценции к более поздним срокам наблюдения. Эти изменения могут свидетельствовать о частичном восстановлении анатомии и функции РПЭ.

При анализе результатов иммунологических исследований TGF- β 1, продукция данного цитокина отсутствовала в большинстве тест проб СТ в группе контроля, в глазах с атрофией до проведения трансплантации, а также в Пб опытной подгруппе (интактный РПЭ) у животных, получающих ММФ в составе КИТ, во Па и Пб опытных подгруппах (атрофия РПЭ) после проведения пересадки на фоне приема КИТ, включающей ЦсА и ММФ. Тогда как в Ia подгруппе отмечали значительное усиление локальной продукции TGF- β 1 на 14 сутки наблюдения, к позднему посттрансплантационному периоду концентрация цитокина снизилась почти до нулевых значений. Полученные данные скорее всего говорят о неспособности ЦсА проникать через неповрежденный ГРБ и оказывать супрессивный эффект. По-видимому, ММФ способен проходить через ГРБ, косвенно об этом говорит нейропротекторный эффект препарата, рассматриваемый в работе Yang P. и соавт. [183].

В отличие от TGF- β 1, TGF- β 2 – основной фактор иммуносупрессии внутренних камер глаза, выявлялся в СТ контроля и опытных групп на всем периоде наблюдения.

Следует отметить, что локальные уровни TGF- β 2 при формировании атрофии РПЭ до проведения трансплантации были значимо выше по сравнению с таковыми в группе контроля ($p < 0,05$). Усиление локального синтеза TGF β 2, выполняющего ключевую роль в контроле внутриглазного воспаления, носило защитный характер и было вызвано атрофическими изменениями РПЭ. В раннем послеоперационном периоде наблюдали сходные изменения продукции TGF- β 2 в обеих опытных подгруппах. Так, на 14 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 практически одинаковых значений во всех группах на фоне приема двух различных режимов иммуносупрессии, однако не было зафиксировано достоверного снижения при сравнении с группой контроля, атрофией до трансплантации, а также при сравнении обеих групп. К 28–60 суткам во всех опытных группах отмечали увеличение локальной продукции TGF- β 2 до диапазона нормы – начальных предоперационных значений в группе без офтальмопатологии.

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 на всем периоде наблюдения на фоне КИТ, включающая ЦсА и ММФ, отмечали незначительные изменения концентрации TSP-1 относительно нормы, достоверных колебаний не было выявлено.

При анализе динамики провоспалительного цитокина IL-2 было выявлено парадоксальное присутствие данного цитокина в СТ здоровых глаз (группа контроля), однако полученные нами данные согласуются с данными работ Girard S. и соавт., (2008); Serrano-Pérez M. C. и соавт., (2011) в которых представлены убедительные доказательства продукции этого цитокина астроглией без участия Т-лимфоцитов [88, 156].

Также статистически значимое повышение интраокулярного уровня IL-2 наблюдали у животных до проведения трансплантации со смоделированной атрофией РПЭ по сравнению с группой контроля. Скорее всего происходит формирование активированного фенотипа микроглии, реализующей локальную защитную реакцию, направленную на предотвращение повреждения сетчатки. Действительно, Girard S. и соавт. описывали подобный ответ с продукцией этого цитокина клетками микроглии при ишемии и травме нервной ткани.

Анализ локальной продукции цитокинов иммунного ответа показал значительный подъем уровня IL-2 в СТ у животных в группе с интактным РПЭ, в особенности в раннем посттрансплантационном периоде в подгруппе, получающей ММФ в составе КИТ (медиана достигла 132,2 пг/мл) ($p < 0,05$). На поздних сроках наблюдения продукция цитокина снизилась до 91,5 пг/мл, однако все равно оставалась на очень высоких значениях. У животных, получающих ЦсА, также был зарегистрирован подъем уровня IL-2 в СТ в раннем посттрансплантационном периоде и наблюдали дальнейшее повышение его концентрации на поздних сроках (до максимальной отметки 23,07 пг/мл) ($p < 0,05$).

Тогда как в эти же сроки наблюдения, в отличие от группы животных-реципиентов без глазной патологии, в СТ кроликов с атрофией РПЭ наблюдали ослабление синтеза данного цитокина, вызванное, скорее всего, действием проникающими через поврежденный ГРБ ЦсА и ММФ, обладающими ингибирующим действием на микроглию.

Уровень интраокулярной продукции IL-6 как в I, так и во II опытной группах в раннем и позднем посттрансплантационном периоде не претерпевал значительных изменений относительно установленного диапазона нормы.

В СК у кроликов с атрофией РПЭ до трансплантации выявлено значительное достоверное снижение (практически в 4 раза) уровня TGF- β 1 по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$), что указывало на ослабление

системной иммунологической толерантности при дегенеративном изменении сетчатки.

В I опытной группе (здоровый глаз) на фоне приема ЦсА и ММФ на 14 сутки наблюдения в СК определяли статистически значимое снижение уровня TGF- β 1 по сравнению с контролем ($p < 0,05$), особенно в подгруппе ММФ. В более позднем периоде наблюдали обратная динамика TGF- β 1, которая характеризовалась достоверным повышением его уровня в СК у животных принимающих ЦсА (значения достигли дооперационных), и напротив, уровень TGF- β 1 продолжил снижаться у кроликов, получающих в составе КИТ ММФ и достиг достоверно низких значений по сравнению с контролем, подгруппой получающей ЦсА в эти же сроки наблюдения и внутри группы при сравнении со значениями на 14 сутки наблюдения (медиана – 42,6 пг/мл) ($p < 0,05$).

Во II опытной группе (с атрофией РПЭ) на 28–60 сутки после введения ИПСК-РПЭ как на фоне ЦсА, так и на фоне ММФ наблюдали снижение системной продукции цитокина. Особенно низкие значения продукции TGF- β 1 в СК регистрировали у кроликов, получавших в качестве системной иммуносупрессии ММФ как в раннем, так и в позднем посттрансплантационном периодах. При этом в этой же группе на 14 сутки наблюдения в подгруппе с ЦсА концентрация указанного цитокина в крови в 2,5 раза достоверно превышала таковую в группе животных с проведенной им трансплантацией ИПСК-РПЭ в здоровый глаз ($p < 0,05$).

В СК у кроликов с атрофией РПЭ до трансплантации выявлено значительное достоверное повышение уровня TGF- β 2 по сравнению с контрольными значениями ($p < 0,05$).

Оценка системной продукции TGF- β 2 показала, что в I опытной группе после трансплантации на фоне различных режимов иммуносупрессии на 14 сутки и в последующем в более поздние периоды не было отмечено значительных колебаний относительно диапазона нормы. В отличие от группы с трансплантацией в здоровый глаз (I группа) в группе с атрофией (II группа)

наблюдала более значительные изменения концентрации цитокина. Итак, выявлено статистически значимое снижение продукции TGF- β 2 во II опытной подгруппе у кроликов, получавших в качестве системной иммуносупрессии ММФ. Данные изменения наблюдали на ранних и поздних сроках наблюдения после проведения пересадки ИПСК-РПЭ, причем более выраженное падение концентрации цитокина было зафиксировано к 28–60 суткам наблюдения. Медианы составили – 858,0 пг/мл на 14 сутки и 544,1 пг/мл – на 28 сутки наблюдения, и 1378,0 пг/мл и 1214,0 пг/мл в группе с ЦсА соответственно.

При анализе концентрации TSP-1 в I опытной группе после субретинального введения ИПСК-РПЭ в СК выявлено значительное увеличение концентрации TSP-1 как в подгруппе с ЦсА, так и с ММФ (достоверные различия получены при сравнении со значениями контроля) ($p < 0,05$), значения оставались стабильно высокими на всем сроке наблюдения. Во II опытной группе на фоне двух режимов иммуносупрессии не наблюдали достоверно значимых колебаний уровня цитокина на всем периоде наблюдения.

На всем протяжении наблюдения в СК животных-реципиентов IL-2 и IL-6 не определялся, что свидетельствовало о прямом достижении системной иммунологической супрессии.

ВЫВОДЫ

1. Нарушения локальной и системной продукции иммунорегуляторных цитокинов, в частности, дисбаланс факторов супрессии TGF- β 1, TGF- β 2 и TSP-1, свидетельствующие о снижении толерантности на уровне глаза и организма, являются патогенетическим звеном атрофии РПЭ в эксперименте и доказывают необходимость использования комбинированной схемы иммуносупрессивной терапии, включающей местное и системное введение иммуносупрессоров, при заместительной трансплантации ИПСК-РПЭ.
2. На основании сравнительного анализа данных клинико-инструментальных исследований получены доказательства безопасности субретинальной трансплантации суспензии ИПСК-РПЭ, проводимой на фоне комбинированной иммуносупрессивной терапии (КИТ), включающей однократную интравитреальную инъекцию триамцинолона ацетонида и последующее ежедневное введение селективного иммуносупрессора (ЦсА или ММФ), о чем свидетельствует анатомическая сохранность сетчатки и других прилежащих структур глаза. Применение двух схем КИТ независимо от включенного в ее состав системного компонента позволяет предотвратить осложнения, связанные с отторжением ксеногенного материала как у животных со здоровыми глазами, так и с атрофией РПЭ.
3. Результаты оценки изменений концентрации цитокинов IL-2, IL-6, TGF- β 1, TGF- β 2 и TSP-1 в СТ и СК животных-реципиентов в ранние и отдаленные сроки наблюдения после трансплантации ИПСК-РПЭ, на фоне двух схем КИТ, говорит о более выраженном как местном, так и системном действии ММФ. Наиболее сильный эффект ММФ отмечен в отношении TGF- β 1 (резком снижении концентраций в СТ и СК реципиентов) - важнейшего регулятора репаративных процессов: дальнейшие исследования в этом направлении могут способствовать

разработке подходов к лечению тяжелой пролиферативной офтальмопатологии.

4. В ходе сравнительного анализа динамики биохимических показателей нефро- и гепатотоксичности СК реципиентов ИПСК-РПЭ, получавших разные схемы комбинированной иммуносупрессивной терапии, установлено, что ЦсА, применяемый в составе КИТ, проявляет более сильное неблагоприятное действие по сравнению с ММФ, о чем свидетельствуют повышение активности АЛТ до 64 Ед/л (превышение в 2 раза по сравнению с группой ММФ ($p < 0,05$) и контролем) и уровня креатина в крови экспериментальных животных как в раннем, так и в отдаленном посттрансплантационном периоде.
5. На основании комплексного анализа данных клинико-инструментальных, иммунологических исследований и биохимических показателей токсичности получено заключение о целесообразности включения ММФ в качестве системного компонента КИТ для профилактики осложнений, связанных с развитием реакции отторжения трансплантата и рядом системных неблагоприятных эффектов при субретинальной заместительной клеточной трансплантации ИПСК-РПЭ в эксперименте.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанная схема комбинированной иммуносупрессивной терапии, способная предотвратить реакцию тканевой несовместимости при субретинальной трансплантации ксеногенного донорского материала, может быть использована для изучения биологических эффектов потенциальных биомедицинских клеточных продуктов на основе клеток человека, трансплантируемых субретинально крупным животным (кроликам) в том числе, с дегенерацией сетчатки, в эксперименте.
2. Доказательства целесообразности применения микофенолата мофетила в составе КИТ при трансплантации ИПСК-РПЭ, а именно: эффективность, менее выраженное побочное действие, подтвержденные на основании комплексного анализа данных клинико-инструментальных и лабораторных исследований, являются отправным пунктом для целого ряда исследований в офтальмологии, главными из которых, по-нашему мнению, являются: а) совершенствование предложенной схемы КИТ, а именно: проведение работ по определению минимально токсичной рабочей дозировки ММФ, способствующей достижению толерантности, для дальнейшего использования в до- и клинических исследованиях; б) в связи с выраженным анти-TGF- β 1 действием, изучение возможностей применения ММФ для лечения тяжелых пролиферативных заболеваний глаз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Астахов, Ю.С. Современные методы диагностики «сухой» формы возрастной макулярной дегенерации / Ю.С. Астахов, А.Б. Лисочкина, П.А. Нечипоренко // Офтальмологические ведомости. – 2010. – Т. 3. № 2. – С. 41-47.
- 2 Балацкая, Н.В. Факторы врожденного иммунитета в патогенезе глаукомы и оптической нейропатии / Н.В. Балацкая, С.Ю. Петров, В.И. Котелин // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2021. – №1. – С. 29–38.
- 3 Баринов, Э.Ф. Молекулярные механизмы формирования друз в сетчатке глаза при возрастной макулярной дегенерации / Э.Ф. Баринов // Офтальмология. – 2020. – № 17(3S). – С. 550-555.
- 4 Бикбов, М.М. Макулярная дегенерация сетчатки в эксперименте / М.М. Бикбов, Р.Р. Файзрахманов, А.Л. Ярмухаметова, Р.М. Бикбулатов. – Текст: непосредственный // Медицинский вестник Башкортостана. – 2012. – Т. 122, – № 4. – С. 53-56.
- 5 Бикбов, М.М. Этиопатогенез неэкссудативной возрастной макулярной дегенерации (обзор литературы) / М.М. Бикбов, Т.А. Халимов // Acta Biomedica Scientifica. – 2022. – № 7(1). – С. 96-105.
- 6 Бойко, Э.В. Антиангиогенная терапия в офтальмологии / Э.В. Бойко // СПб. ВМедА им. СМ Кирова. – 2013. – 292 с.
- 7 Гайдук К.Ю. Клеточные технологии в лечении пациентов в возрастной макулярной дегенерацией: современное состояние проблемы / К.Ю. Гайдук, С.В. Чурашов, А.Н. Куликов // Офтальмологические ведомости. – 2019. – Т.12. № 4. – С. 35-41.
- 8 Егоров, Е.А. Возрастная макулярная дегенерация. Вопросы патогенеза, диагностики и лечения / Е.А. Егоров, И.А. Романенко // Клиническая офтальмология. – 2009. – Т. 10(1). – С. 42-45.
- 9 Еричев, В.П. Роль цитокинов в патогенезе глазных болезней / В. П. Еричев, С.Ю. Петров, А.М. Суббот [и др.]. Текст: непосредственный // Национальный журнал глаукома. – 2017. – Т. 16, № 1. – С. 87-101.

- 10 Ермилов, В.В. Корреляции метаболических нарушений в структурах глаза со старением, апоптозом и зависимыми от возраста заболеваниями / В.В. Ермилов, О.В. Махонина. - Текст: непосредственный // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2011. – Т. 37, № 1. – С. 67-70.
- 11 Ермакова, Н.А. Роль воспаления в развитии возрастной макулярной дистрофии. / Н.А. Ермакова // Вестник офтальмологии. – 2018. № 6. – С. 116- 122.
- 12 Зак, П.П. Экспериментальная модель ускоренного старения сетчатки: японский перепел *coturnix japonica* / П.П. Зак, А.В. Зыкова, Н.Н. Трофимова, [и др.]. – Текст: непосредственный // Сенсорные системы. – 2012.
- 13 Коротких, С.А. Антиангиогенная терапия неоваскулярных заболеваний макулярной области (отдаленные результаты) / С.А. Коротких, Е.В. Бобыкин, Н.С. Назарова, [и др.]. //Вестник офтальмологии. – 2016. – Т. 132. – № 1. – С. 76-84.
- 14 Лагарькова, М.А. Анализ результатов трансплантации ретинального пигментного эпителия в эксперименте / М.А. Лагарькова, Л.А. Катаргина, Н.С. Измайлова, [и др.] // Гены и Клетки. – 2023. – Т. 18. – № 2. – С. 123–132.
- 15 Милюткина, С.О. Функциональные нарушения макулярной области сетчатки как фактор развития социально-психологической дезадаптации у больных возрастной макулярной дегенерацией / С.О. Милюткина, М.А. Ковалевская // Прикладные информационные аспекты медицины: научно-практический журнал. – 2014. – Т. 17, № 1. – С. 128-136.
- 16 Нероев, В.В. Изучение локальной экспрессии мРНК генов медиаторов воспаления в модели атрофии ретинального пигментного эпителия и дегенерации сетчатки, индуцированной субретинальным введением физиологического раствора в эксперименте у кроликов / В.В. Нероев, Н.В.

- Балацкая, Е.В. Светлова, [и др.] // Медицинская иммунология. – 2021. – № 23 (4). – С. 813–818.
- 17 Нероев, В.В. Особенности локальной экспрессии мрнк, IL-1 β , IL-18, CCL2/MCP-1 при моделировании атрофии пигментного эпителия и дегенерации сетчатки в эксперименте на кроликах / В.В. Нероев, Н.В. Балацкая, Е.В. Светлова, [и др.] // Молекулярная медицина. – 2021. – Т. 19. – №2. – С. 54– 62.
- 18 Нероев, В.В. Механизмы иммунорегуляции и трансплантационный иммунитет при пересадках роговицы / В.В. Нероев, Н.В. Балацкая, Е.В. Ченцова, [и др.] // Медицинская иммунология. – 2020. – № 22 (1). – С. 61–76.
- 19 Нероев, В.В. Клинико-функциональные характеристики вторичной географической атрофии на фоне экссудативной возрастной макулярной дегенерации / В.В. Нероев, М.В. Зуева, Н.В. Нероева, [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2021. – Т. 76. – №4. – С. 384-393.
- 20 Нероева, Н.В. Динамика клинико-иммунологических показателей при трансплантации ретинального пигментного эпителия на фоне применения комбинированной иммуносупрессивной терапии в модели дегенерации сетчатки на кроликах / Н.В. Нероева, Н.В. Балацкая, В.В. Нероев, А.Г. Бриллиантова, Л.А. Катаргина, М.А. Лагарькова // Российский иммунологический журнал. – 2024. – Т. 27. – № 4. – С. 787-794.
- 21 Нероева, Н.В. Заместительная трансплантация стволовыми клетками при атрофии ретинального пигментного эпителия в эксперименте / Н.В. Нероева, В.В. Нероев, Л.А. Катаргина // Вестник офтальмологии. – 2022. – Т. 138(3). – С. 7–1.
- 22 Нероева, Н.В. Иммунная привилегия в субретинальном пространстве и перспективы трансплантации ретинального пигментного эпителия при дегенеративных заболеваниях сетчатки / Н.В. Нероева, Н.В. Балацкая, Л.А.

- Катаргина, А.Г. Бриллиантова // Российский офтальмологический журнал. – 2023. – № 16(4). – С. 152-158.
- 23 Нероева, Н.В. Клинико-иммунологический анализ трансплантации ретинального пигментного эпителия, полученного из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, в условиях фармакологической иммуносупрессии у кроликов / Н.В. Нероева, Н.В. Балацкая, А.Г. Бриллиантова, [и др.] // Офтальмология. – 2024. – № 21(1). – С. 193-204.
- 24 Нероева, Н.В. Особенности локальной экспрессии генов цитокинов иммунного ответа, трофических и вазорегулирующих факторов при моделировании атрофии ретинального пигментного эпителия / Н.В. Нероева, Н.В. Балацкая, В.В. Нероев, [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – № 172 (10). – С. 466–473.
- 25 Нероева, Н.В. Изучение локальной экспрессии генов инфламмосомного комплекса при моделировании дегенерации сетчатки *in vivo* / Н.В. Нероева, О.А. Свитич, В.В. Нероев, [и др.] // Медицинская иммунология. – 2023. – № 25(3). – С.631– 636.
- 26 Пат. № 2727000 Российская Федерация, МПК7 А61F 9/007, G09В 23/28. Способ моделирования атрофии ретинального пигментного эпителия: № 2019118981 : заявл. 19.06.2019 : опубл. 17.07.2020 / Нероев В.В., Нероева Н.В., Рябина М.В., Зуева М.В., Цапенко И.В., Илюхин П.А., Киселёва Т.Н., Кармокова А.Г., Лосанова О.А., Майбогин А.М. ; заявитель и патентообладатель ФГБУ "НМИЦ ГБ им. Гельмгольца" Минздрава России. – 10 с. : ил. – Текст: непосредственный.
- 27 Пат. № 2709247 Российская Федерация, МПК7 G09В 23/28. Способ моделирования атрофии ретинального пигментного эпителия: № 2019126782 : заявл. 26.08.2019 : опубл. 17.12.2019 / Нероев В.В., Катаргина Л.А., Нероева Н.В., Рябина М. В., Зуева М.В., Цапенко И.В., Илюхин П.А., Киселёва Т.Н., Кармокова А.Г., Лосанова О.А., Майбогин А.М. ; заявитель

- и патентообладатель ФГБУ "НМИЦ ГБ им. Гельмгольца" Минздрава России. – 13 с. : ил. – Текст: непосредственный.
- 28 Пат. № 2729937 Российская Федерация, МПК G09B 23/28. Способ субретинальной трансплантации клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ), дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, при атрофии ретинального пигментного эпителия в эксперименте: №2019136663 заявл. 15.11.2019: опубл. 13.08.2020 / Нероева Н.В., Нероев В.В., Катаргина Л.А. и др. заявитель и патентообладатель ФГБУ "НМИЦ ГБ им. Гельмгольца" Минздрава России. – 13 с. : ил. – Текст: непосредственный.
- 29 Пат. № 2730937 Российская Федерация, МПК A61F 9/007. Способ трансплантации клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ), дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, при атрофии ретинального пигментного эпителия. Патент на изобретение 2730937 С1, 26.08.2020. Заявка № 2019135075 от 01.11.2019 / Нероева Н.В., Нероев В.В., Катаргина Л.А. и др.; заявитель и патентообладатель ФГБУ "НМИЦ ГБ им. Гельмгольца" Минздрава России. – 13 с. : ил. – Текст: непосредственный.
- 30 Пат. № 2830558 Российская Федерация, МПК A61K38/13. Способ изучения биологического действия потенциальных биомедицинских клеточных продуктов на основе клеток человека при субретинальной ксеногенной трансплантации в эксперименте. Патент на изобретение № 2024109400 заявл. 08.04.2024., опубл. 21.11.2024 / Нероева Н.В., Балацкая Н.В., Бриллиантова А.Г., Катаргина Л.А. и др.; заявитель и патентообладатель ФГБУ "НМИЦ ГБ им. Гельмгольца" Минздрава России. – 9 с. : ил. – Текст: непосредственный.
- 31 Слепова, О.С. Цитокины в слёзной жидкости и сыворотке крови как ранние биомаркеры возрастной макулярной дегенерации / О.С. Слепова, Е.А. Еремеева, М.В. Рябина, [и др.] // Медицинская иммунология. – 2015. – №17(3). – С. 245-252.

- 32 Смолякова, Г.П. Возрастная макулярная дегенерация, сухая форма. Современные подходы к профилактике и медикаментозному лечению / Г.П. Смолякова, В.В. Егоров, О.В. Коленко, [и др.] // Здоровоохранение Дальнего Востока. – 2019. – № 3. – С. 56-60.
- 33 Уткина, О.А. Эффективность трансплантации ретинального пигментного эпителия на экспериментальной модели его атрофии: дис. ... канд. мед. наук: 3.1.5. / Уткина Ольга Александровна; науч. рук. В.В. Нероев – Москва, 2024. – 149 с.
- 34 Файзрахманов, Р.Р. Анти-VEGF терапия неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации: от рандомизированных исследований к реальной клинической практике / Р.Р. Файзрахманов // Российский офтальмологический журнал. – 2019. – № 12(2). – С. 97-105.
- 35 Фурсова, А.Ж. Прогностические факторы эффективности антиангиогенной терапии при неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации / А.Ж. Фурсова, Н.В. Чубарь, М.С. Тарасов, [и др.] // Вестник офтальмологии. – 2018. – № 134(1). – С. 48-55.
- 36 Харитонов, А.Е. Возможности использования плюрипотентных стволовых клеток для восстановления поврежденного пигментного эпителия сетчатки глаза // А.Е. Харитонов, А.В. Сурдина, О.С. Лебедева, [и др.] // Acta Naturae. – 2018. – Т. 10. – №3. – С. 30– 39.
- 37 Хаценко, Е.И. Технология подготовки и трансплантации 3D клеточных сфероидов ретинального пигментного эпителия в эксперименте: дис. ...канд. мед. наук: 14.01.07, 14.01.24 / Хаценко Евгений Игоревич; науч. рук. С.А. Борзенко – Москва, 2019. – 141 с.
- 38 Шамхалова, Х.М. Разработка клинико-иммунологических критериев прогнозирования и оптимизация иммуносупрессивного лечения при кератопластике высокого риска: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.07, 14.03.09 / Шамхалова Ханика Магомедовна; науч. рук. В.В. Нероев, Н.В. Балацкая – Москва, 2021. – 115 с.

- 39 Шеремет, Н.Л. Возможности лечения заболеваний сетчатки, сопровождающихся повреждением ретинального пигментного эпителия / Н.Л. Шеремет, А.А. Микаелян, А.Ю. Андреев [и др.] // Вестник офтальмологии. – 2019. – Т. 135(5). – С 226-234.
- 40 Allison, A.C. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection / A.C. Allison, E.M. Eugui // *Transplantation*. – 2005. – № (2 Suppl). – P. 181–190.
- 41 Anderson, D.H. The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis revisited / D.H. Anderson, M.J. Radeke, N.B. Gallo, [et al.] // *Prog Retin Eye Res*. – 2010. – № 29. – P. 95–112.
- 42 Bali, S. Systemic immunosuppression in high-risk penetrating keratoplasty: A Systematic Review / S. Bali, R. Filek, F. Si, W.Hodge, [et al.] // *J clinmed Res*. – 2016. – № 8 (4). – P. 269–276.
- 43 Beauchesne, P.R. Cyclosporine A: A review of current oral and intravenous delivery systems / P.R.Beauchesne, N.S. Chung, K.M. Wasan // *Drug Dev Ind Pharm*. – 2007. – Vol. 33. – P. 211–220.
- 44 Bhattacharya, S. Characterization of Mycophenolate Mofetil gastrointestinal toxicity and risk factors for severe disease and poor prognosis. / S. Bhattacharya, G. Stoleru, P.Patel, [et al.] // *Inflamm Bowel Dis*. – 2022; – P 28(5). – P. 811–814.
- 45 Bhutto, I. Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex / I. Bhutto, G. Luttu. // *Mol Aspects Med*. – 2012. – № 33(4). – P. 295–317.
- 46 Birnbaum, F. Immunosuppression with cyclosporine A and mycophenolate mofetil after penetrating high-risk keratoplasty: a retrospective study / F. Birnbaum, D. Böhringer, Y. Sokolovska, [et al.] // *Transplantation*. – 2005. – Vol. 79, № 8. – P. 964–968.

- 47 Birnbaum, F. Mycophenolate mofetil following penetrating high-risk keratoplasty: long-term results of a prospective, randomised, multicentre study / F. Birnbaum, S. Mayweg, A. Reis // *Eye (London, England)*. – 2009. – Vol. 23, №11. – P. 2063– 2070.
- 48 Brandl, C. Features of Age-Related Macular Degeneration in the General Adults and Their Dependency on Age, Sex and Smoking: Results from the German KORA Study / C. Brandl, V. Breinlich, K.J. Stark, [et al.] // *Plos One*. – 2016. – № 11(11):e0167181.
- 49 Branisteanu, D. Influence of unilateral intravitreal bevacizumab injection on the incidence of symptomatic choroidal neovascularization in the fellow eye in patients with neovascular age related macular degeneration / D. Branisteanu, D. Branisteanu, C. Feraru, [et al.] // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2020. – Vol. 20, № 6. – P. 182.
- 50 Canto-Soler, V. Stem cell sources and their potential for the treatment of retinal degenerations / V. Canto-Soler, M. Flores-Bellver, M.N. Vergara // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 57. – 2016. – Vol. 57, № 5: orsfd1-9.
- 51 Caramoy, A. A reply to human retinal pigment epithelium (RPE) transplantation: outcome after autologous RPE-choroid sheet and RPE cell-suspension in a randomised clinical study / A. Caramoy // *Br J Ophthalmol*. –2011. – № 95(3):431.
- 52 Carson, C.T. Stem cells: the good, bad and barely in control / C.T. Carson, S. Aigner, F.H. Gage // *Nat Med*. –2006. – Vol.12, № 11. – P. 1237– 1238.
- 53 Casalino, G. Clinical Course of Treated Choroidal Neovascularization in Eyes with Pre-existing Geographic Atrophy: Case Series and Reappraisal of the Literature / G. Casalino, A. Arrigo, U. Introini, [et al.] // *Curr Eye Res*. – 2021. – Vol. 46, № 7. – P. 988– 994.
- 54 Choi, J. A comparison of genetically matched cell lines reveals the equivalence of human ipscs and escs / J. Choi, S. Lee, W. Mallard, [et al.] // *Nat Biotechnol*. – 2015. – Vol. 33, №11. – P 1173– 1181.

- 55 Clayton, P.A. Mycophenolate versus azathioprine for kidney transplantation: A 15-year follow-up of a randomized trial / P.A. Clayton S. P. McDonald, J. R. Chapman, S. J. Chadban, [et al.] // *Transplantation*. – 2012. – Vol.94. – P. 152–158.
- 56 Colombo, D. Cyclosporine in transplantation - a history of converging timelines / D. Colombo, E. Ammirati // *J Biol Regul Homeost Agents*. – 2011. Vol. 25, № 4. – P. 493– 504.
- 57 Costa, D.C. Case-control study of subconjunctival triamcinolone acetone injection vs intravenous methylprednisolone pulse in the treatment of endothelial corneal allograft rejection / D.C. Costa, R.S. de Castro, N. Kara-Jose // *Eye*. – 2009. – Vol.23. – P.708– 714.
- 58 Coureau, B. Cushing's syndrome induced by misuse of moderate- to high-potency topical corticosteroids / B. Coureau, J.F. Bussi eres, S. Tremblay // *Ann Pharmacother*. – 2008. – Vol. 42, № 12. – P.1903– 1907.
- 59 Crafoord, S. Cyclosporine treatment of RPE allografts in the rabbit subretinal space / S. Crafoord, P.V. Algvere, E.D. Kopp, S. Seregard / *Acta Ophthalmol Scand*. – 2000. – Vol. 78, № 2. – P.122– 129.
- 60 Cuenca, N. Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases / N. Cuenca, L. Fernandez-Sanchez, L. Campello, [et al.] // *Prog Retin Eye Res*. – 2014. – Vol. 43. – P. 17–75.
- 61 Cunha-Vaz, J. Blood-retinal barrier / J. Cunha-Vaz, R. Bernardes, C. Lobo // *Eur J Ophthalmol*. – 2011. – Vol. 21, Suppl. 6. – P. 3– 9.
- 62 Curcio, C.A. Antecedents of soft drusen, the specific deposits of age-related macular degeneration, in the biology of human macula / C.A. Curcio // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2018. – Vol. 59, № 4.– P. 182– 194.
- 63 Daien, V.. Evolution of treatment paradigms in neovascular age-related macular degeneration: a review of real-world evidence. V. Daien, R.P. Finger, J.S. Talks, [et al.] // *British Journal of Ophthalmology*. – 2021. – Vol. 105, № 11. – P. 1475– 1479.

- 64 Dartt, A.D. Immunology, inflammation and diseases of the eye / A.D. Dartt, R. Dana, P. D'Amore, [et al.] // Academic Press. – 2011.– P. 50–57, 38–42.
- 65 Davis, F.A. The Anatomy and Histology of the Eye and Orbit of the Rabbit. / F.A. Davis //Trans Am Ophthalmol Soc. – 1929. – Vol. 27. – P. 400–441.
- 66 Davis, R.J. The developmental stage of adult human stem cell-derived retinal pigment epithelium cells influences transplant efficacy for vision rescue / R.J. Davis, N.M. Alam, C. Zhao, [et al.] // Stem Cell Reports. – 2017. – Vol. 9. – P. 42–49.
- 67 De Simone, R. NGF promotes microglial migration through the activation of its high affinity receptor: modulation by TGF-beta / R. De Simone, E. Ambrosini, D. Carnevale, [et al.] // J Neuroimmunol. – 2007. – Vol. 190. – P. 53–60.
- 68 Del Priore, LV. Triple Immune Suppression Increases Short-Term Survival of Porcine fetalretinal Pigment Epithelium Xenografts / L.V. Del Priore, O. Ishida, E.W. Johnson, [et al.] // Invest ophthalmology and visual science. – 2003. – Vol. 44. № 9. – P. 4044–4053.
- 69 Desai, D. Complement cascade inhibition in geographic atrophy: a review / D. Desai, P.U. Dugel // Eye (London). – 2022. – № 36 (2). – P. 294– 302.
- 70 Domhan, S. Molecular mechanisms of the antiangiogenic and antitumor effects of mycophenolic acid / S. Domhan, S. Muschal, C. Schwager, [et al.] // Mol Cancer Ther. – 2008. – № 7 (6). – P. 1656– 1668.
- 71 Drukker, M. Human embryonic stem cells and their differentiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells. / M. Drukker, H. Katchman, G. Katz, [et al.] // Stem Cells. – 2006. – № 24 (2) – P. 221–229.
- 72 Enzmann, V. The local and systemic secretion of the pro-inflammatory cytokine interleukin-6 after transplantation of retinal pigment epithelium cells in a rabbit model / V. Enzmann, F. Faude, P. Wiedemann, [et al.] // Curr Eye Res. – 2000. – № 21(1). – P.530–534.
- 73 Faramarzi, A. Topical 0.03% tacrolimus versus systemic mycophenolate mofetil as adjuncts to systemic corticosteroids for preventing graft rejection after repeat

- keratoplasty: one-year results of a randomized clinical trial / A. Faramarzi, H. Abbasi, S. Feizi, [et al.] // *Eye (London)*. – 2021. – № 35(10). – P. 2879–2888.
- 74 Faunce, D.E. NKT cell-derived RANTES recruits apcs and CD8+ T Cells to the spleen during the generation of regulatory T cells in tolerance / D.E. Faunce, J. Stein-Streilein // *Journal of immunology*. – 2002. – №169 (1). – P. 31–38.
- 75 Fel, A. Indications et complications des corticoïdes en ophtalmologie [Eye and corticosteroid's use] / A. Fel, E. Aslangul, C. Le Jeune // *Presse medicale (Paris, France)*. – 2012. – № 41(4). – P. 414–421.
- 76 Ferguson, T.A. The role of Fas ligand and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in the ocular immune response / T.A. Ferguson, T.S. Griffith // *Chemical immunology and allergy*. – 2007. № 92. – P. 140–154.
- 77 Ferris, F. L. 3rd. Clinical classification of age-related macular degeneration / F.L. Ferris 3rd, C.P. Wilkinson, A. Bird, [et al.] // *Ophthalmology*. – 2013. – № 120(4). – P. 844–851.
- 78 Flaxman, S.R. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis / S.R. Flaxman, R.R.A. Bourne, S. Resnikoff, [et al.] // *The Lancet. Global Health*. – 2017. – № 5(12). – P. 1221–1234.
- 79 Flechner, S.M. Calcineurin inhibitor-sparing regimens in solid organ transplantation: Focus on improving renal function and nephrotoxicity / S.M. Flechner, J. Kobashigawa, G. Klintmalm // *Clin Transplant*. – 2008. – Vol.22. – P. 1–15.
- 80 Fleckenstein, M. The progression of geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration / M. Fleckenstein, P. Mitchell, K.B. Freund, [et al.] // *Ophthalmology*. – 2018. – Vol. 12, № 3. – P. 369–390.
- 81 Frimat, L. Impact of cyclosporine reduction with MMF: a randomized trial in chronic allograft dysfunction. The 'reference' study. / L. Frimat, E. Cassuto-Viguiier, B. Charpentier, [et al.] // *American journal of transplantation*. – 2006. – № 6 (11). – P. 2725–2734.

- 82 Fu, D.J. Pegcetacoplan treatment and consensus features of geographic atrophy over 24 months / D.J. Fu, P. Bagga, G. Naik, [et al.] // *JAMA Ophthalmology*. – 2024. – №142(6). – P. 548–558.
- 83 Fujii, S. Strategy for personalized treatment of IPS-retinal immune rejections assessed in cynomolgus monkey models / S. Fujii, S. Sugita, Y. Futatsugi, [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – № 21(9). 3077.
- 84 Gehrs, K.M. Complement, age-related macular degeneration and a vision of the future / K.M. Gehrs, J.R. Jackson, E.N. Brown, [et al.] // *Archives of ophthalmology*. – 2010. – № 128. – P. 349–358.
- 85 Georgiou, M. Inherited Retinal Diseases: Therapeutics, clinical trials and end points-A review / M. Georgiou, K. Fujinami, M. Michaelides // *Clinical and experimental ophthalmology*. – 2021. – Vol. 49. – P. 270–288.
- 86 Getting, S.J. Melanocortin 3 receptors control crystal-induced inflammation / S.J. Getting, C.W. Lam, A.S. Chen, [et al.] // *FASEB Journal*. – 2006. № 20. – P. 2234–2241.
- 87 Gibson, J. Determination of a gene and environment risk model for age-related macular degeneration / J. Gibson, A. Cree, A. Collins // *The British journal of ophthalmology*. – 2010. – № 94 (10). – P. 382–387.
- 88 Girard, S. Lipopolysaccharide and hypoxia/ischemia induced IL-2 expression by microglia in neonatal brain / S. Girard, A. Larouche, H. Kadhim, [et al.] // *Neuroreport*. – 2008. – № 19 (10). – P. 997–1002.
- 89 Go, E. Mycophenolic acid induces senescence of vascular precursor cells / E. Go, S.P. Tarnawsky, W.C. Shelley [et al.] // *Plos One*. – 2018. – № 13(3):e0193749.
- 90 Gordon, S. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions / S. Gordon, F.O. Martinez // *Immunity*. – 2010. – № 32. – P. 593–604.
- 91 Gosset, C. New insights in antibody-mediated rejection / C. Gosset, C. Lefaucheur, D. Glotz // *Curr Opin Nephrol Hypertens*. – 2014. – № 23. – P. 597–604.

- 92 Hageman, G.S. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to AMD / G.S. Hageman, D.H. Anderson, L.V. Johnson, [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2005. – № 102. – P.7227–7232.
- 93 Hassan, M. New therapies in development for the management of non-infectious uveitis: A review. / M. Hassan, S. Karkhur, J.H. Bae, [et al.] // *Clin Exp Ophthalmol*. – 2019. – № 47(3). – P. 396-417.
- 94 Heier J.S. OAKS and DERBY study investigators. Pegcetacoplan for the treatment of geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration (OAKS and DERBY): two multicentre, randomised, double-masked, sham-controlled,. (phase 3 trials) / J.S. Heier, E.M. Lad, F.G. Holz, [et al.] // *Lancet*. – 2023. – № 402(10411). – P.1434-1448.
- 95 Hill, J.C. Immunosuppression in corneal transplantation / J.C. Hill // *Eye*. – 1995. – Vol. 9. – P. 247-253.
- 96 Hirsch, L. TGF- β 2 secretion from RPE decreases with polarization and becomes apically oriented / L. Hirsch, H. Nazari, P.G. Sreekumar, [et al.] // *Cytokine*. – 2015. – № 71(2). – P. 394-396.
- 97 Holan, V. Mesenchymal stem cell-based therapy for retinal degenerative diseases: Experimental models and clinical trials / V. Holan, K. Palacka, B. Hermankova // *Cells*. – 2021. – № 10 (3). – P.588.
- 98 Holz, F.G. Geographic atrophy: clinical features and potential therapeutic approaches / F.G. Holz, E.C. Strauss, S. Schmitz-Valckenberg, [et al.] // *Ophthalmology*. – 2014. – № 121 (5). – P. 1079–1091.
- 99 Ilmarinen, T. Ultrathin polyimide membrane as cell carrier for subretinal transplantation of human embryonic stem cell derived retinal pigment epithelium / T. Ilmarinen, H. Hiidenmaa, P. Kööbi, [et al.] // *plos One*. – 2015. – № 10(11): e0143669.
- 100 Jaffe, G. J. C5 Inhibitor Avacincaptad Pegol for geographic atrophy due to age-related macular degeneration: A randomized pivotal phase 2/3 trial / G.J. Jaffe, K. Westby, K.G. Csaky // *Ophthalmology*, – 2021. – № 128(4). – P. 576–586.

- 101 Jiang, L.Q. Subretinal space and vitreous cavity as immunologically privileged sites for retinal allografts / L.Q. Jiang, M. Jorquera, J.W. Streilein // *Investigative Ophthalmology & Visual Science* November. – 1993. – Vol. 34. – P. 3347-3354.
- 102 Kanda, A. A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration / A. Kanda, W. Chen, M. Othman, [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2007. – 104. – P. 16227–16232.
- 103 Karlstetter, M. Retinal microglia: just bystander or target for therapy? / M. Karlstetter, R. Scholz, M. Rutar // *Prog Retin Eye Res*. – 2015. – № 45. – P. 30–57.
- 104 Kaszubski, P. Geographic atrophy and choroidal neovascularization in the same eye: A Review. / P. Kaszubski, T. Ben Ami, C. Saade // *Ophthalmic Res*. – 2016. – № 55(4). – P.185-193.
- 105 Kawazoe, Y. Retinoic acid from retinal pigment epithelium induces T regulatory cells / Y. Kawazoe, S. Sugita, H. Keino, [et al.] // *Exp Eye Res*. – 2012. – № 94. – P. 32–40.
- 106 Keino, H. Immune privilege and eye-derived T-regulatory cells / H. Keino, S. Horie, S. Sugita // *J Immunol Res*. – 2018. 1679197.
- 107 Kennelly, K.P. Early subretinal allograft rejection is characterized by innate immune activity / K.P. Kennelly, T.M. Holmes, D.M. Wallace, [et al.] // *Cell Transplant*. – 2017. – № 26. – P. 983–1000.
- 108 Kiddee, W. Intraocular pressure monitoring post intravitreal steroids: a systematic review / W. Kiddee, G.E. Trope, L. Sheng, [et al.] // *Survey of ophthalmology*, – 2013. – № 58(4). – P. 291–310.
- 109 Klein, R.J. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration / R.J. Klein, C. Zeiss, E.Y. Chew, [et al.] // *Science*. – 2005. – № 308. – P. 385–389.

- 110 Kramer, J. Immunological considerations for retinal stem cell therapy / J. Kramer, K.R. Chirco, D.A. Lamba // *Adv Exp Med Biol.* – 2019. – № 1186. – P. 99–119.
- 111 Lai, C.C. Local immunosuppression prolongs survival of RPE xenografts labeled by retroviral gene transfer / C.C. Lai, P. Gouras, K. Doi, [et al.] // *Investophthalmol vis sci.* – 2000. – № 41(10). – P. 3134-41.
- 112 Li, Y. Long-term safety and efficacy of human-induced pluripotent stem cell (IPS) grafts in a preclinical model of retinitis pigmentosa / Y. Li, Y.T. Tsai, C.W. Hsu, [et al.] // *Mol Med.* – 2012. – № 18(1). – P. 1312-1319.
- 113 Lim, L.S. Age-related macular degeneration / L.S. Lim, P. Mitchell, J.M. Seddon, [et al.] // *Lancet.* – 2012. – Vol. 379, № 9827. – P. 1728–1738.
- 114 Liu, Z. Surgical transplantation of human RPE stem cell-derived RPE monolayers into non-human primates with immunosuppression / Z. Liu, B.H. Parikh, Q.S.W. Tan, [et al.]. // *Stem Cell Reports.* – 2021. – Vol. 16, No. 2. – P. 237–251.
- 115 Ma, F.Y., Woodman, N., Mulley, W.R., Kanellis, J., Nikolic-Paterson, D.J. Macrophages contribute to cellular but not humoral mechanisms of acute rejection in rat renal allografts. // *Transplantation.* – 2013. – Vol. 96. – P. 949–957.
- 116 Manzia, T.M., Angelico, R., Toti, L., Bellini, M.I., Sforza, D., [et al.]. Long-term, maintenance MMF monotherapy improves the fibrosis progression in liver transplant recipients with recurrent hepatitis C // *Transplant International.* – 2011. – Vol. 24, No. 5. – P. 461–468.
- 117 Marei, H.E., Althani, A., Lashen, S., Cenciarelli, C., Hasan, A. Genetically unmatched human iPSC and ESC exhibit equivalent gene expression and neuronal differentiation potential // *Scientific Reports.* – 2017. – Dec 13; Vol. 7, No. 1. – Article 17504.
- 118 Martinez, F.O., Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment // *F1000Prime Reports.* – 2014. – Vol. 6. – Article 13

- 119 Martinez, F.O., Helming, L., Gordon, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective // *Annual Review of Immunology*. – 2009. – Vol. 27. – P. 451–483.
- 120 Masli, S., Turpie, B., Hecker, K.H., Streilein, J.W. Expression of thrombospondin in TGF-beta-treated APCs and its relevance to their immune deviation-promoting properties // *Journal of Immunology*. – 2002. – Mar 1. – Vol. 168, No. 5. – P. 2264–2273.
- 121 Masli, S., Turpie, B., Streilein, J.W. Thrombospondin orchestrates the tolerance-promoting properties of TGF-beta-treated antigen-presenting cells // *International Immunology*. – 2006. – May. – Vol. 18, No. 5. – P. 689–699.
- 122 Matsuba, M., Hutcheon, A.E., Zieske, J.D. Localization of thrombospondin-1 and myofibroblasts during corneal wound repair // *Experimental Eye Research*. – 2011. – Vol. 93, No. 4. – P. 534–540.
- 123 McGill, T.J., Stoddard, J., Renner, L.M., et al. Allogeneic iPSC-derived RPE cell graft failure following transplantation into the subretinal space in nonhuman primates // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2018. – Vol. 59. – P. 1374–1383.
- 124 Mecha, M., Carrillo-Salinas, F.J., Feliu, A., Mestre, L., Guaza, C. Microglia activation states and cannabinoid system: Therapeutic implications // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2016. – Vol. 166. – P. 40–55.
- 125 Medawar, P. Immunity to homologous grafted skin. III. The fate of skin homografts transplanted to the brain to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye // *British Journal of Experimental Pathology*. – 1948. – Vol. 29. – P. 58–69.
- 126 Miller, K., Successful engraftment of high-risk corneal allografts with short-term immunosuppression with cyclosporine // *Transplantation*. – 1988. – Vol. 45. – P. 651–653.
- 127 Mitchell, P., Liew, G., Gopinath, B., Wong, T.Y. Age-related macular degeneration // *The Lancet*. – 2018. – Vol. 392. – P. 1147–1159.

- 128 Morath, C., Schwenger, V., Beimler, J., Mehrabi, A., Schmidt, J., Zeier, M., Muranyi, W. Antifibrotic actions of mycophenolic acid // *Clinical Transplantation*. – 2006. – Vol. 20, Suppl. 17. – P. 25–29.
- 129 Morath, C., Zeier, M. Review of the antiproliferative properties of mycophenolate mofetil in non-immune cells // *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. – 2003. – Vol. 41, No 10. – P. 465–469.
- 130 Murphy-Ullrich, J.E., Poczatek, M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. – 2000. – Vol. 11, No 1-2. – P. 59–69.
- 131 Newell, K.A., Turka, L.A. Tolerance signatures in transplant recipients // *Current Opinion in Organ Transplantation*. – 2015. – Vol. 20, No 4. – P. 400–405.
- 132 Ng, T.F., Turpie, B., Masli, S. Thrombospondin-1-mediated regulation of microglia activation after retinal injury // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2009. – Vol. 50. – P. 5472–5478.
- 133 Nishida, T., Miyata, S., Itoh, Y., et al. Anti-inflammatory effects of alpha-melanocyte stimulating hormone against rat endotoxin-induced uveitis and the time course of inflammatory agents in aqueous humor // *International Immunopharmacology*. – 2004. – Vol. 4. – P. 1059–1066.
- 134 Nita, M., Strzałka-Mrozik, B., Grzybowski, A., Romaniuk, W., Mazurek, U. Ophthalmic transplantology: posterior segment of the eye-part II // *Medical Science Monitor*. – 2012. – Jun. – Vol. 18, No 6. – P. 97–103.
- 135 Noell, W.K., Walker, V.S., Kang, B.S., Berman, S. Retinal damage by light in rats // *Investigative Ophthalmology*. – 1966. – Vol. 5. – P. 450–473.
- 136 Öner, A. Stem cell treatment in retinal diseases: recent developments // *Turkish Journal of Ophthalmology*. – 2018. – Vol. 48, No 1. – P. 33–38.
- 137 Paglinawan, R., Malipiero, U., Schlapbach, R., et al. TGF beta directs gene expression of activated microglia to an anti-inflammatory phenotype strongly focusing on chemokine genes and cell migratory genes // *Glia*. – 2003. – Vol. 44. – P. 219–231.

- 138 Park, J.I., Song, G.W., Ryu, J.H., Choi, S.T., Choi, N.G., et al. A multicenter, randomized, open-label study to compare the efficacy and safety of tacrolimus and corticosteroids in combination with or without mycophenolate mofetil in liver transplantation recipients infected with hepatitis B virus // *Transplant Proceedings*. – 2023. – Vol. 55, No. 2. – P. 387–395.
- 139 Parlakpınar, H., Gunata, M. Transplantation and immunosuppression: a review of novel transplant-related immunosuppressant drugs // *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. – 2021. – Vol. 43, No. 6. – P. 651–665.
- 140 Patocka, J., Nepovimova, E., Kuca, K., Wu, W. Cyclosporine A: Chemistry and toxicity - A review // *Current Medicinal Chemistry*. – 2021. – Vol. 28, No. 20. – P. 3925–3934.
- 141 Paul, C., Garat, H. Ciclosporine [Cyclosporine] // *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. – 2011. – Vol. 138, No. 12. – P. 836–838. (In French).
- 142 Pennington, K.L., de Angelis, M.M. Epidemiology of age-related macular degeneration (AMD): associations with cardiovascular disease phenotypes and lipid factors // *Eye and Vision*. – 2016. – Vol. 3. – P. 34.
- 143 Petrash, C.C., Palestine, A.G., Canto-Soler, M.V. Immunologic rejection of transplanted retinal pigmented epithelium: mechanisms and strategies for prevention // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 621007.
- 144 Poetker, D.M., Reh, D.D. A comprehensive review of the adverse effects of systemic corticosteroids // *Otolaryngologic Clinics of North America*. – 2010. – Vol. 43, No. 4. – P. 753–768.
- 145 Rajendran Nair, D.S., Zhu, D., Sharma, R., Martinez Camarillo, J.C., Bharti, K., Hinton, D.R., Humayun, M.S., Thomas, B.B. Long-term transplant effects of iPSC-RPE monolayer in immunodeficient RCS rats // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, No. 11. – P. 29–51.
- 146 Raoul, W., Keller, N., Rodero, M., et al. Role of the chemokine receptor CX3CR1 in the mobilization of phagocytic retinal microglial cells // *Journal of Neuroimmunology*. – 2008. – Vol. 198. – P. 56–61.

- 147 Rashid, K., Akhtar-Schaefer, I., Langmann, T. Microglia in retinal degeneration // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1975.
- 148 Raugi, G.J., Olerud, J.E., Gown, A.M. Thrombospondin in early human wound tissue // *Journal of Investigative Dermatology*. – 1987. – Vol. 89, No. 6. – P. 551–554.
- 149 Reinhard, T., [et al.]. Systemic mycophenolate mofetil avoids immune reactions in penetrating high-risk keratoplasty: preliminary results of an ongoing prospectively randomized multicentre study // *Transplant International*. – 2005. – Vol. 18. – P. 703–708.
- 150 Rezaei, K.A., Farrokh-Siar, L., Godowski, K., Patel, S.C., Ernest, J.T. A model for xenogenic immune response // *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. – 2000. – Apr. – Vol. 238, No. 4. – P. 352–358.
- 151 Riskalla, M.M., Somers, E.C., Fatica, R.A., McCune, W.J. Tolerability of mycophenolate mofetil in patients with systemic lupus erythematosus // *Journal of Rheumatology*. – 2003. – Vol. 30, No. 7. – P. 1508–1512.
- 152 Rose, M.L., [et al.]. Mycophenolate mofetil decreases antibody production after cardiac transplantation // *Journal of Heart and Lung Transplantation*. – 2002. – Vol. 21. – P. 282–285.
- 153 Rossi, D.C., Ribi, C., Guex-Crosier, Y. Treatment of chronic non-infectious uveitis and scleritis // *Swiss Medical Weekly*. – 2019. – Vol. 149. – P. w20025.
- 154 Schmeding, M., Kiessling, A., Neuhaus, R., Heidenhain, C., Bahra, M., et al. Mycophenolate mofetil monotherapy in liver transplantation: 5-year follow-up of a prospective randomized trial // *Transplantation*. – 2011. – Vol. 92, No. 8. – P. 923–929.
- 155 Schwartz, S.D., Regillo, C.D., Lam, B.L., [et al.]. Human embryonic stem cell-derived RPE in patients with AMD and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies // *The Lancet*. – 2015. – Vol. 385, No. 9967. – P. 509–516.
- 156 Serrano-Pérez, M.C., Martín, E.D., Vaquero, C.F., 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 // *Journal of Neuroinflammation*. – 2011. – Vol. 59, No. 1. – P. 94
- 157 Sollinger, H.W. Mycophenolate in transplantation // *Clinical Transplantation*. – 2004. – Vol. 18. – P. 485–492.
- 158 Stahl, A. The diagnosis and treatment of age-related macular degeneration // *Deutsches Ärzteblatt Online*. – 2020. – Vol. 117, No. 29-30. – P. 513–520.
- 159 Stanzel, B., Ader, M., Liu, Z., [et al.]. Surgical approaches for cell therapeutics delivery to the retinal pigment epithelium and retina // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2019. – Vol. 1186. – P. 141–170.
- 160 Stanzel, B.V., Liu, Z., Somboonthanakij, S., Wongsawad, W., Brinken, R., Eter, N., [et al.]. Human RPE Stem Cells Grown Into Polarized RPE Monolayers on a Polyester Matrix are Maintained After Grafting Into Rabbit Subretinal Space // *Stem Cell Reports*. – 2014. – Vol. 2. – P. 64–77.
- 161 Stone, E.M. Macular degeneration / E.M. Stone // *Annual review of medicine*. – 2007. – Vol. 58. – P. 477–490.
- 162 Sugita, S., Iwasaki, Y., Makabe, K., [et al.]. Lack of T cell response to iPSC-derived retinal pigment epithelial cells from HLA homozygous donors // *Stem Cell Reports*. – 2016. – Vol. 7. – P. 619–634.
- 163 Sugita, S., Makabe, K., Fujii, S., Iwasaki, Y., Kamao, H., Shiina, T., [et al.]. Detection of retinal pigment epithelium-specific antibody in iPSC-derived retinal pigment epithelium transplantation models // *Stem Cell Reports*. – 2017. – Vol. 9. – P. 1501–1515.
- 164 Sugita, S., Mandai, M., Kamao, H., Takahashi, M. Immunological aspects of RPE cell transplantation // *Progress in Retinal and Eye Research*. – 2021. – Vol. 84. – Article 100950.
- 165 Sugita, S., Usui, Y., Horie, S., [et al.]. T-cell suppression by programmed cell death 1 ligand 1 on retinal pigment epithelium during inflammatory conditions // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2009. – Vol. 50, No. 6. – P. 2862–2870.

- 166 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 // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, No. 18. – Article 6507.
- 167 Suh, H.S., Zhao, M.L., Derico, L., Choi, N., Lee, S.C. Insulin-like growth factor 1 and 2 (IGF1, IGF2) expression in human microglia: differential regulation by inflammatory mediators // *Journal of Neuroinflammation*. – 2013. – Vol. 10. – Article 37.
- 168 Surjushe, A., Saple, D.G. Mycophenolate mofetil // *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*. – 2008. – Vol. 74, No. 2. – P. 180–184.
- 169 Takeuchi, O., Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation // *Cell*. – 2010. – Vol. 140. – P. 805–820.
- 170 Taylor, A.W., Lee, D.J. The alpha-melanocyte stimulating hormone induces conversion of effector T cells into Treg cells // *Journal of Transplantation*. – 2011. – Article 246856.
- 171 Taylor, A.W., Ng, T.F. Negative regulators that mediate ocular immune privilege // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2018. – Jun. – Vol. 103, No. 6. – P. 1179–1187.
- 172 Taylor, A.W., Streilein, J.W., Cousins, S.W. Identification of alpha-melanocyte stimulating hormone as a potential immunosuppressive factor in aqueous humor // *Current Eye Research*. – 1992. – Vol. 11. – P. 1199–1206.
- 173 Taylor, A.W. Review of the activation of TGF-Beta in immunity // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2009. – Vol. 85, No. 1. – P. 29–33.
- 174 Tinckam, K.J., Djurdjev, O., Magil, A.B. Glomerular monocytes predict worse outcomes after acute renal allograft rejection independent of C4d status // *Kidney International*. – 2005. – Vol. 68. – P. 1866–1874.
- 175 Ugarte, M., Hussain, A.A., Marshall, J. An experimental study of the elastic properties of the human Bruch's membrane-choroid complex: relevance to

- ageing // *British Journal of Ophthalmology*. – 2006. – Vol. 90, No. 5. – P. 621–626.
- 176 Weisz, J.M., Humayun, M.S., De Juan, E.J., [et al.]. Allogenic fetal retinal pigment epithelial cell transplant in a patient with geographic atrophy // *Retina*. – 1999. – Vol. 19, No. 6. – P. 540–545.
- 177 Wenkel, H., Streilein, J.W. Evidence that retinal pigment epithelium functions as an immune-privileged tissue // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2000. – Vol. 41. – P. 3467–3473.
- 178 Wilbanks, G.A., Streilein, J.W. Studies on the induction of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID). I. Evidence that an antigen-specific, ACAID-inducing, cell-associated signal exists in the peripheral blood // *Journal of Immunology*. – 1991. – Vol. 146, No. 8. – P. 2610–2617.
- 179 Wong, W.L., Su, X., Li, X., Cheung, C.M., Klein, R., Cheng, C.Y., Wong, T.Y. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis // *The Lancet Global Health*. – 2014. – Feb. – Vol. 2, No. 2. – P. e106–116.
- 180 Wu, X.G., Xin, M., Yang, L.N., Shi, W.Y. The biological characteristics and pharmacodynamics of a mycophenolate mofetil nanosuspension ophthalmic delivery system in rabbits // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2011. – Apr. – Vol. 100, No. 4. – P. 1350–1361.
- 181 Xian, B., Huang, B. The immune response of stem cells in subretinal transplantation // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2015. – Sep 14. – Vol. 6. – Article 161.
- 182 Xu, H., Chen, M. Targeting the complement system for the management of retinal inflammatory and degenerative diseases // *European Journal of Pharmaceutics*. – 2016. – Vol. 787. – P. 94–104.
- 183 Yang, P., Lockard, R., Titus, H., Hiblar, J., Weller, K., [et al.]. Suppression of cGMP-dependent photoreceptor cytotoxicity with mycophenolate is neuroprotective in murine models of retinitis pigmentosa // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2020. – Vol. 61, No. 10. – Article 25.

- 184 Yin, Y., Henzl, M.T., Lorber, B., [et al.]. Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal ganglion cells // *Nature Neuroscience*. – 2006. – Vol. 9. – P. 843–852.
- 185 Yu, C., Roubeyx, C., Sennlaub, F., Saban, D.R. Microglia versus monocytes: distinct roles in degenerative diseases of the retina // *Trends in Neurosciences*. – 2020. – Vol. 43. – P. 433–449.
- 186 Zamiri, P., Masli, S., Kitaichi, N., Taylor, A.W., Streilein, J.W. Thrombospondin plays a vital role in the immune privilege of the eye // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2005. – Vol. 46. – P. 908–919.
- 187 Zandman-Goddard, G., Shoenfeld, Y. Mycophenolate mofetil in animal models of autoimmune disease // *Lupus*. – 2005. – Vol. 14. – P. 12–15.
- 188 Zarbin, M. Cell-based therapy for degenerative retinal disease // *Trends in Molecular Medicine*. – 2016. – Feb. – Vol. 22, No. 2. – P. 115–134.
- 189 Zhou, R., Caspi, R.R. Ocular immune privilege // *F1000 Biological Reports*. – 2010. – Vol. 2. – P. 1–3.
- 190 Zhou, T., Huang, Z., Sun, X., Zhu, X., Zhou, L., [et al.]. Microglia polarization with M1/M2 phenotype changes in rd1 mouse model of retinal degeneration // *Frontiers in Neuroanatomy*. – 2017. – Vol. 11. – Article 77.
- 191 Zhou, X.X., Song, Y.P., Zhao, Y.X., Wu, J.G. Induction of branch retinal vein occlusion by photodynamic therapy with rose bengal in a rabbit model [Internet] // *Advances in Ophthalmology*. – Intech; 2012.
- 192 Zierhut, M., Stübiger, N., Siepmann, K., Deuter, C.M. MMF and eye disease // *Lupus*. – 2005. – Vol. 14. Suppl 1. – P. 50–54.