

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

### ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ $\alpha_2$ -МАКРОГЛОБУЛИНА И ЭНДОТЕЛИНА-1 В СЛЁЗНОЙ ЖИДКОСТИ КРОЛИКОВ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОК РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

*Н.В. Нероева<sup>1</sup>, В.В. Нероев<sup>1</sup>, Н.Б. Чеснокова<sup>1\*</sup>, Л.А. Катаргина<sup>1</sup>, Т.А. Павленко<sup>1</sup>, О.В. Безнос<sup>1</sup>,  
П.А. Илюхин<sup>1</sup>, О.А. Уткина<sup>1</sup>, М.А. Лагарькова<sup>2</sup>, П.П. Лактионов<sup>3</sup>, А.Н. Богомазова<sup>3</sup>, А.Е. Харитонов<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца,  
105062, Москва, Садовая-Черногрозская ул., 14/19; \*эл. почта: nchesnokova2012@yandex.ru

<sup>2</sup>Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины

Федерального медико-биологического агентства, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

<sup>3</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины

Сибирского отделения Российской академии наук, 630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

Заболевания сетчатки, связанные с нарушением функционирования или гибелью клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ), широко распространены, трудно поддаются лечению и во всем мире являются ведущей причиной слепоты и слабовидения. Трансплантация клеток РПЭ, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК-РПЭ), является перспективным методом лечения этих заболеваний. Для обеспечения долгосрочной выживаемости трансплантата необходимо динамическое наблюдение за посттрансплантационным процессом. Материалом для оценки метаболических изменений в сетчатке может служить слёзная жидкость, доступная для неинвазивного получения и исследования в динамике процесса. С целью поиска биомаркеров в слёзной жидкости, отражающих характер течения посттрансплантационного процесса в сетчатке, были выбраны полифункциональные биорегуляторы —  $\alpha_2$ -макроглобулин ( $\alpha_2$ -МГ) и эндотелин-1 (ЭТ-1). У кроликов моделировали атрофию РПЭ путём субретинального введения раствора бевацизумаба и через месяц в субретинальное пространство вводили ИПСК-РПЭ в виде суспензии или в виде монослоя на биосовместимой мембране, имитирующей нативную мембрану Бруха. Активность  $\alpha_2$ -МГ в слёзной железе повышалась в опытном и парном глазах на 7-14 день после трансплантации за счет действия применяемой в этот период кортикостероидной терапии и у 50% кроликов через 2-3 месяца, по-видимому, вследствие развития воспалительной иммунной реакции. Содержание ЭТ-1 в слёзной железе резко падало на 7-14 день и через 7 месяцев после трансплантации, что может влиять на тонус сосудов в тканях глаза. Полученные результаты свидетельствуют, что исследование биорегуляторов в слёзной жидкости может позволить проводить мониторинг локальных метаболических процессов после пересадки РПЭ, что важно для проведения своевременной, обоснованной и персонализированной медикаментозной коррекции посттрансплантационного процесса.

**Ключевые слова:** индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ретинальный пигментный эпителий; трансплантация; слёзная жидкость;  $\alpha_2$ -макроглобулин; эндотелин-1; оптическая когерентная томография

**DOI:** 10.18097/PBMC20226805352

## ВВЕДЕНИЕ

Ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) представляет собой монослой гексагональных клеток между фоторецепторными клетками сетчатки и сосудистой оболочкой глаза. Функции РПЭ многообразны. Он обеспечивает так называемый внешний гемато-ретинальный барьер, регуляцию и поддержание водного и ионного балансов в субретинальном пространстве, участвует в регенерации светочувствительного пигмента родопсина, обеспечивает поглощение избыточных световых волн. Барьерная функция РПЭ и его способность регулировать поведение иммунных клеток формируют иммунную толерантность сетчатки [1]. Нарушение функциональности или утрата этих клеток приводит к необратимой потере зрения.

Заболевания сетчатки, связанные с нарушением функционирования или гибелью клеток РПЭ, такие как пигментный ретинит, дистрофия сетчатки,

возрастная макулярная дегенерация и др. широко распространены, трудно поддаются лечению и во всём мире являются ведущей причиной слепоты и слабовидения [2].

В настоящее время использование клеток РПЭ, дифференцированных из плюрипотентных стволовых клеток (эмбриональные стволовые клетки, ИПСК), индуцированные плюрипотентные клетки, ИПСК), является одним из способов терапии заболеваний, связанных с дегенерацией этого типа клеток. Данный метод считается наиболее перспективным для клеточной терапии заболеваний, вызванных дегенерацией РПЭ. Однако, согласно ФЗ №180 от 23.06.2016, эмбриональные стволовые клетки человека, как и фетальные клетки, не могут использоваться в качестве источника клеточных продуктов. Таким образом, ИПСК остаются практически единственным источником клеток для получения ПЭС для трансплантации в России [3].

Результаты клинических исследований, которые проведены пока на малом количестве пациентов с продвинутыми стадиями заболевания, показали улучшение зрительных функций и небольшое количество осложнений и побочных эффектов при пересадке РПЭ, дифференцированного из плюрипотентных стволовых клеток (ПСК-РПЭ), что свидетельствует о перспективности этого метода лечения [4]. Разрабатываются различные технологии трансплантации ПСК-РПЭ и протоколы медикаментозного сопровождения, однако для уточнения их эффективности необходимы комплексные исследования.

Имеются экспериментальные доказательства того, что ИПСК-РПЭ, трансплантированные в субретинальное пространство, могут выполнять несколько основных функций нативного РПЭ, включая фагоцитоз наружных сегментов фоторецепторов, обновление зрительного пигмента и транспорт метаболитов [5]. В экспериментах *in vitro* показано, что эти клетки ингибируют активацию Т-лимфоцитов, увеличивают их апоптоз и усиливают секрецию некоторых противовоспалительных цитокинов, то есть обладают иммуносупрессивными свойствами [6].

При разработке методик трансплантации необходимо учитывать данные исследований отдалённых последствий трансплантации ИПСК-РПЭ, в ходе которых была показана гибель от 30% до 50% трансплантируемых клеток [7]. В клинических исследованиях также отмечены случаи отторжения аллогенных трансплантатов, однако авторы подчеркивают, что при соответствующем медикаментозном сопровождении возможно контролировать иммунные атаки с помощью местных кортикостероидов, а также использования системных иммуносупрессивных препаратов при отсутствии тяжёлых иммунных реакций после трансплантации [8].

Нарушение целостности и/или воспалительный процесс в РПЭ, которые возможны при трансплантации, снижают его барьерные и иммуносупрессивные способности, что может привести к отторжению трансплантата. Следует также учитывать, что пересадка клеток РПЭ у пациентов проводится на фоне патологического процесса в сетчатке, в том числе вялотекущего воспаления, как, например, при возрастной макулярной дистрофии. При трансплантации также возможна хирургическая травма сетчатки. Поэтому для обеспечения долгосрочной выживаемости трансплантата необходимо динамическое наблюдение за посттрансплантационным процессом и своевременная персонализированная медикаментозная коррекция [9].

Современные технологии позволяют неинвазивно оценивать морфологические (оптическая когерентная томография, флуоресцентная ангиография) и функциональные (электрофизиологические исследования) изменения в сетчатке после трансплантации. Предложены различные варианты протоколов введения этих клеток, схем медикаментозного сопровождения. Однако отсутствуют сведения о возможности неинвазивного исследования

метаболических изменений (биомаркеры), которые предшествуют морфологическим и функциональным изменениям. Это помогло бы прогнозировать ход развития посттрансплантационного процесса и проводить превентивное целенаправленное медикаментозное воздействие до наступления необратимых изменений [10]. Материалом для исследования может служить слёзная жидкость. Её можно легко, неинвазивно и многократно получать для динамического наблюдения. Однако работ по исследованию слёзной жидкости при трансплантации РПЭ в доступной литературе мы не обнаружили. Биохимические процессы, протекающие в слёзной жидкости, отражают характер течения метаболических процессов не только в омываемых ею структурах, но и в сетчатке вследствие общих механизмов гуморальной и нервной регуляции.

В качестве биомаркеров, отражающих характер течения посттрансплантационного процесса в сетчатке, мы выбрали полифункциональные биорегуляторы:  $\alpha_2$ -макроглобулин ( $\alpha_2$ -МГ) и эндотелин-1 (ЭТ-1). В предыдущих работах нами было показано изменение уровня  $\alpha_2$ -МГ и ЭТ-1 при нейродегенеративных процессах в сетчатке [11] и установлено, что деструктивные процессы в ней сопровождаются повышением активности  $\alpha_2$ -МГ в слёзной жидкости [12].

Полифункциональный белок  $\alpha_2$ -МГ — это белок острой фазы воспаления, ингибитор протеолитических ферментов. Благодаря способности транспортировать или элиминировать широкий круг цитокинов и факторов роста, он является иммуномодулятором [13]. Основным эффектор эндотелиновой системы ЭТ-1 помимо мощного вазоконстрикторного действия участвует в регуляции воспалительных и иммунных процессов и играет важную роль в патогенезе многих глазных болезней [14]. Измерение содержания этих регуляторов в биологических жидкостях проводится при пересадке различных органов для оценки вероятности их отторжения [15].

Целью данной работы был анализ динамики уровня  $\alpha_2$ -МГ и ЭТ-1 в слёзной жидкости кроликов с моделью атрофии сетчатки после трансплантации ИПСК-РПЭ человека, обоснование использования определения этих метаболитов в слезе для характеристики посттрансплантационного процесса.

## МЕТОДИКА

В исследование включены 17 кроликов (34 глаза) породы Новозеландский альбинос (самцы в возрасте 2,5-3 месяцев, весом около 2,0 кг). В первой серии экспериментов у 9 кроликов моделировали атрофию РПЭ путём субретинального введения в один глаз раствора бевацизумаба, содержащего 0,025 мг препарата, ранее описанным методом [16, 17]. Через 1 месяц после моделирования атрофии выполняли субретинальное введение клеток ИПСК-РПЭ. Для получения функциональных клеток РПЭ была произведена направленная

дифференцировка из ИПСК человека, ранее полученных из фибробластов здорового донора в лаборатории клеточной биологии ФНКЦ ФХМ России и хранящихся в клеточном банке лаборатории [18].

В первой группе животных (5 кроликов) в одном глазу проводили трансплантацию ИПСК-РПЭ в виде клеточной суспензии путём субретинального введения 0,05 мл суспензии клеток в фосфатно-солевом буферном растворе ("ПанЭко", Россия), содержащей 50000 клеток. Для предотвращения рефлюкса трансплантированных клеток в витреальную полость место их введения герметизировали с помощью аутологичной плазмы крови, обогащённой тромбоцитами [19].

Трансплантацию ИПСК-РПЭ, фиксированных в виде монослоя на подложке из желатина и нановолокон гидрофильного полиуретана толщиной 50 мкм, полученной методом электроспиннинга, производили путём введения в зону атрофии сетчатки через её линейный разрез [19].

Предоперационная подготовка животных включала внутримышечное введение 0,3 мл золетила-50 и 0,55 мл ксилазина 2%. Перед операцией внутримышечно вводили 0,3 мл дексаметазона 0,4% и 0,5 мл этамзилата 12,5%. Мидриаз достигался закапыванием тропикамида 1% и фенилэфрина 2,5%. Перед операцией закапывали моксифлоксацин 0,5% и алкаин 0,5%. После хирургического вмешательства всем кроликам субконъюнктивально вводили гентамицин и дексаметазон в дозе 3 мг/кг веса и 0,2 мг/кг веса соответственно. В последующие 7 дней в конъюнктивальную полость 3 раза в день закапывали дексаметазон 0,1%. После введения клеток РПЭ интравитреально вводили 0,2-0,3 мл суспензии кеналога 40 (40 мг/мл).

Оценку течения посттрансплантационного процесса проводили методами офтальмоскопии и оптической когерентной томографии (ОКТ) с помощью томографа Heidelberg Spectralis™ SD-OCT ("Heidelberg Engineering", Германия) до оперативного вмешательства и далее на 2 сутки, 14 сутки и через 2 месяца после него.

Забор слезы проводили до воспроизведения модели атрофии РПЭ, через 1 месяц после него (перед трансплантацией) и далее на 3 сутки, 7 сутки, 14 сутки, 21 сутки, 28 сутки, через 2 месяца, 3 месяца и 6 месяцев после трансплантации.

Во второй серии экспериментов проводили изучение влияния инъекционной травмы и применяемых после трансплантации препаратов на содержание  $\alpha_2$ -МГ и ЭТ-1 в слёзной жидкости в ранние сроки после введения. В первой группе животных (4 кролика, 8 глаз) вводили в оба глаза однократно интравитреально 0,2 мл физиологического раствора, второй группе (4 кролика, 8 глаз) — такое же количество кеналога 40. Далее в течение 7 дней всем животным в один глаз 3 раза в день закапывали дексаметазон 0,1%, во второй — физиологический раствор. Забор слезы проводили до инъекции и на 3 сутки, 7 сутки, 14 сутки, 21 сутки, 28 сутки после неё.

Слёзную жидкость забирали из обоих глаз с помощью кружков из фильтровальной бумаги Ø 5 мм, которые помещали за нижнее веко на 5 мин, затем компоненты слезы элюировали в течение 20 мин физиологическим раствором в соотношении 50 мкл на 1 кружок, центрифугировали 10 мин при 1734 g с охлаждением (Allegra X-22, "Beckman Coulter", Германия), и супернатант использовали для исследований. В нём определяли активность  $\alpha_2$ -МГ ферментативным методом со специфическим субстратом N-бензоил-DL-аргинин-p-нитроанилидом (БАПНА) ("Sigma-Aldrich", США) [20]. Активность  $\alpha_2$ -МГ выражали в нмоль/мин·мл слезы. Концентрацию ЭТ-1 определяли методом иммуноферментного анализа с помощью диагностического набора ELISA kit for Endothelin-1 ("Cloud-Clone Corp", США). Определение оптической плотности образцов проводили на многофункциональном фотометре для микропланшета Synergy MX ("BioTek", США).

Статистическая обработка результатов проведена с использованием статистического пакета Microsoft Excel и Statistica 10.0. Для оценки достоверности различий между группами с уровнем значимости не менее 95% был применён непараметрический U-критерий Манна-Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

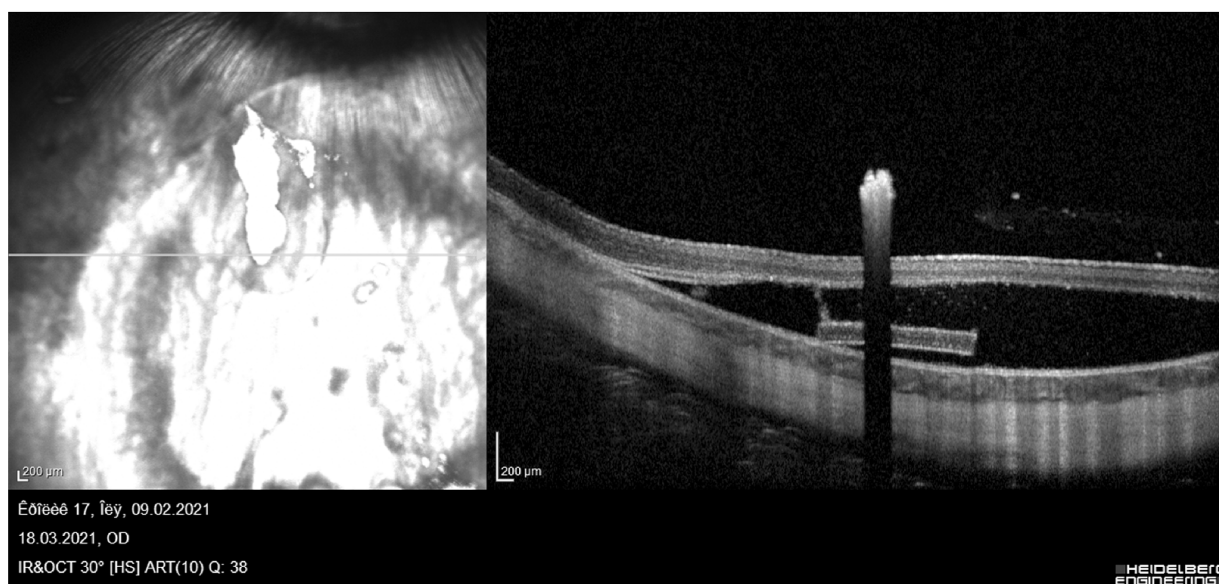
Введение ИПС-РПЭ в субретинальное пространство в области атрофии РПЭ проводили через месяц после моделирования атрофии, когда активность  $\alpha_2$ -МГ и содержание ЭТ-1 в слёзной жидкости были такими же, как у интактных кроликов.

По данным ОКТ, в первые 2 дня после трансплантации у большинства кроликов в месте введения клеток наблюдалось неплотное прилегание сетчатки, либо отслойка сетчатки. У 3 кроликов, которым была введена суспензия клеток, сетчатка прилегала, и не было выявлено видимых изменений. К 9-10 дню наблюдения у 8 кроликов из 9 сетчатка прилегала, подложка находилась в правильном положении (рис. 1, 2).

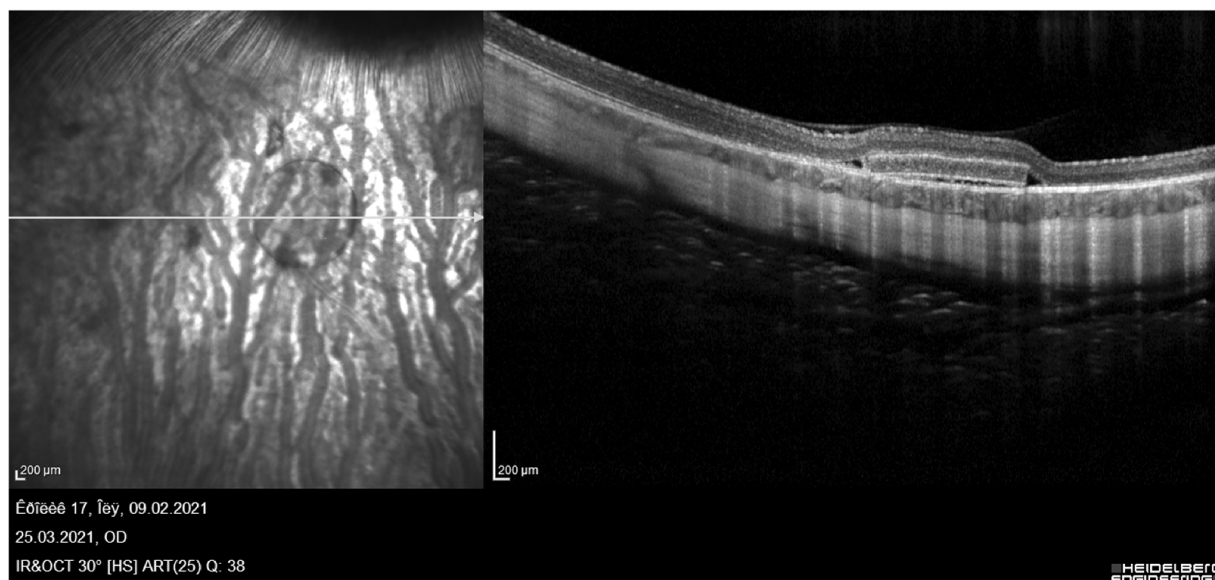
В период от 7 до 14 суток после трансплантации в слезе и опытных, и парных глаз происходил значительный подъём активности  $\alpha_2$ -МГ ( $p < 0,01$  по сравнению с исходным уровнем). Сходная динамика наблюдалась при введении клеток как на подложке, так и в виде суспензии (рис. 3).

Максимальное повышение активности  $\alpha_2$ -МГ у разных кроликов отмечено нами либо на 7, либо на 14 сутки, и в обеих группах достигало  $1,85 \pm 0,83$  нмоль/мин·мл, что статистически достоверно отличается от исходного уровня, равного  $0,55 \pm 0,15$  нмоль/мин·мл ( $p < 0,01$ ). В парных глазах активность  $\alpha_2$ -МГ также повышалась. В эти же сроки значительно снижалось содержание ЭТ-1 в слезе обоих глаз у всех кроликов ( $p < 0,01$  по сравнению с исходным уровнем) (рис. 4).

Через 1 месяц при ОКТ исследовании не было отмечено выраженных изменений сетчатки, однако у всех кроликов определялась умеренная деформация



**Рисунок 1.** ОКТ, день 2 после трансплантации: в зоне введения определяется невысокая отслойка сетчатки, подложка находится под сетчаткой, не прилегает к сосудистой оболочке.



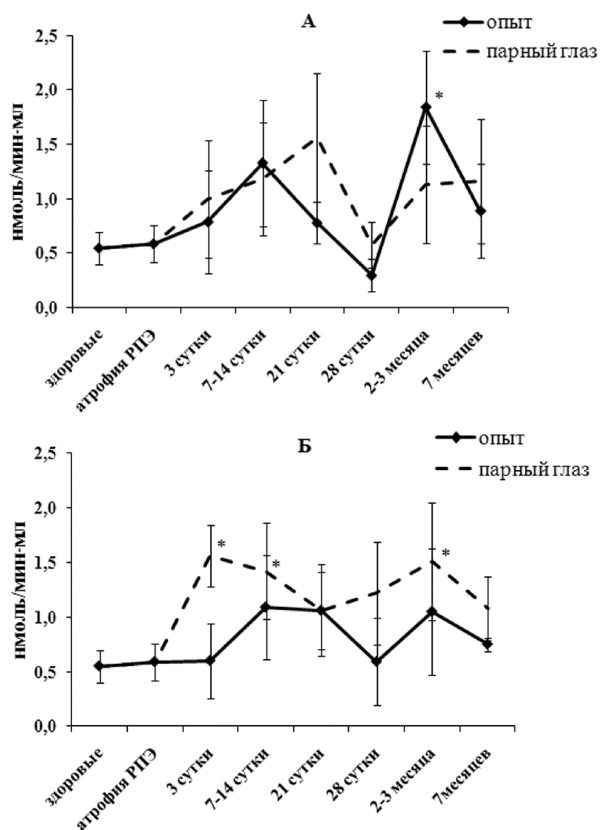
**Рисунок 2.** ОКТ, день 9 после трансплантации: сетчатка прилежит, подложка в правильном положении, неплотное прилегание сетчатки у краев подложки, между подложкой и хориоидеей видно щелевидное пространство.

нейроэпителия. В этот период значения активности  $\alpha_2$ -МГ и содержания ЭТ-1 в слёзной жидкости у всех кроликов были в пределах нормы.

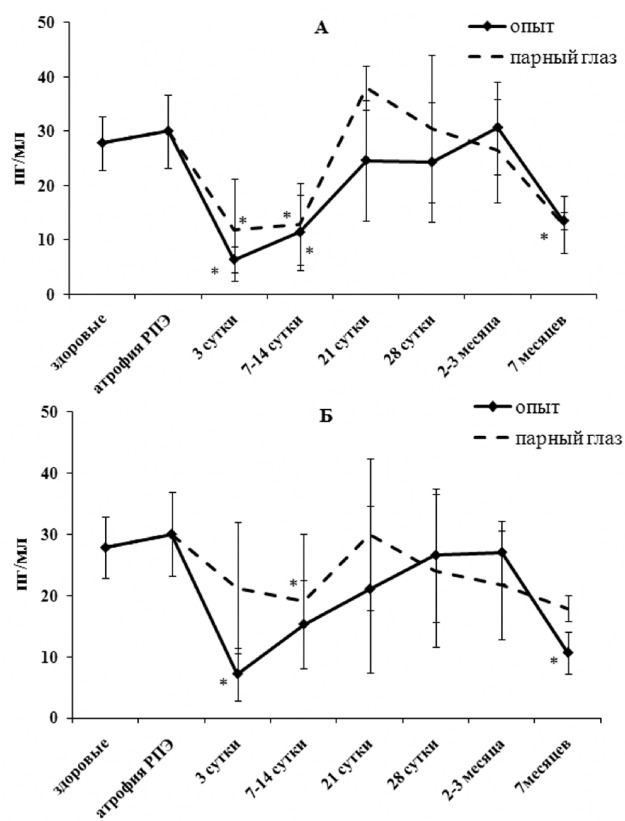
Через 2-3 месяца после трансплантации ИПСК-РПЭ на подложке у 3 из 4 кроликов отмечалось появление плотного содержимого между подложкой и сосудистой оболочкой и смещение подложки. При введении суспензии клеток изменения были менее выражены (рис. 5).

В этот период вновь наблюдался подъём активности  $\alpha_2$ -МГ, который можно связать с развитием клеточной иммунной реакции на нахождение ИПСК-РПЭ в сетчатке. Максимальная активность  $\alpha_2$ -МГ в среднем составляла  $1,43 \pm 0,93$  нмоль/мин·мл

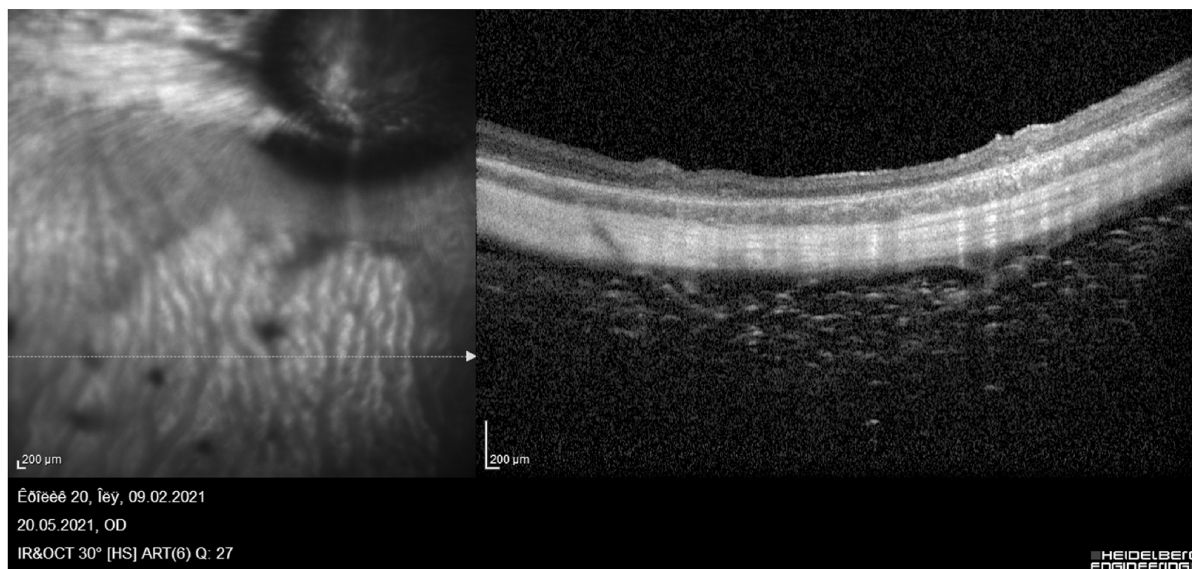
при введении суспензии клеток, а при введении клеток на подложке —  $2,76 \pm 0,89$  нмоль/мин·мл. Такое различие можно объяснить более сильным механическим воздействием на сетчатку подложки по сравнению с клеточной суспензией, что может сказываться на состоянии гематоофтальмического барьера и сопровождаться нарушением иммунной толерантности. В этот период статистически значимых изменений среднего содержания ЭТ-1 в слезе кроликов не происходило. Однако у 1 кролика, которому вводили клетки на подложке, и у 3 кроликов, которым вводили суспензию клеток, концентрация ЭТ-1 существенно снизилась, что также свидетельствует об индивидуальной реакции на трансплантацию.



**Рисунок 3.** Активность  $\alpha_2$ -МГ (нмоль/мин·мл) в слёзной жидкости кроликов после моделирования атрофии РПЭ и трансплантации ИПСК-РПЭ на подложке (а) и в виде суспензии (б). Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  стандартная ошибка среднего. \* –  $p < 0,01$  по сравнению с исходным уровнем.



**Рисунок 4.** Концентрация эндотелина-1 (пг/мл) в слёзной жидкости кроликов после моделирования атрофии РПЭ и трансплантации ИПСК-РПЭ на подложке (а) и в виде суспензии (б). Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  стандартная ошибка среднего. \* –  $p < 0,01$  по сравнению с исходным уровнем.



**Рисунок 5.** ОКТ, день 2 месяца после трансплантации: определяется зона умеренной деформации сетчатки, соответствующая месту введения суспензии клеток, под нейроэпителием неравномерно распределённое гиперэхогенное содержимое.

На более поздних сроках наблюдения (6-7 месяцев) на ОКТ-изображениях выраженных изменений сетчатки у кроликов, которым была введена клеточная суспензия, не выявлено. У кроликов, которым были трансплантированы клетки на подложке,

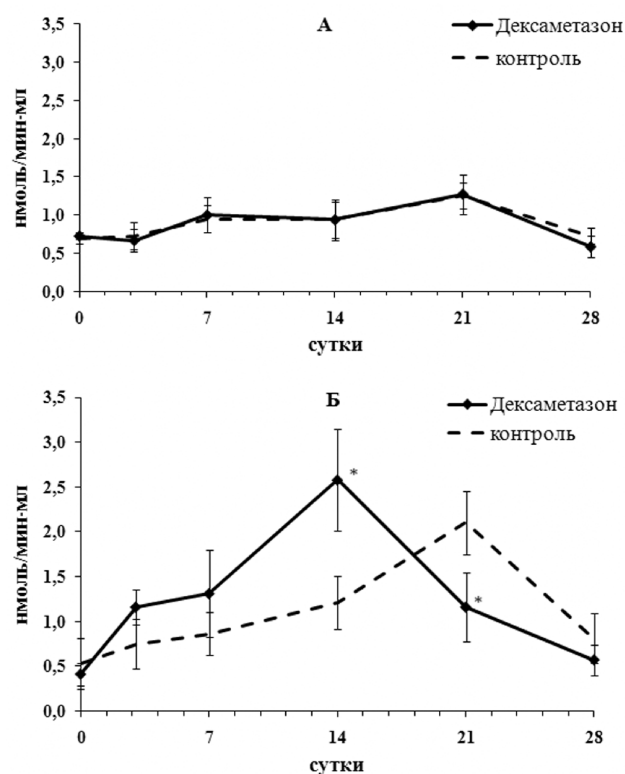
отмечались деформация и истончение нейроэпителия, появление кистоподобных полостей в сетчатке. В этот период в слёзной жидкости активность  $\alpha_2$ -МГ приближалась к нормальным значениям в обоих глазах у всех кроликов, кроме одного. Надо отметить,

что у этого кролика активность  $\alpha_2$ -МГ в слезе ещё до трансплантации превышала уровень нормы, а течение посттрансплантационного процесса было более тяжёлым, чем у других.

Содержание ЭТ-1 в слёзной жидкости через 7 месяцев после трансплантации достоверно снизилось в обоих глазах у всех кроликов ( $p < 0,01$ ), что является свидетельством продолжающейся реакции на введение клеток.

Обращает на себя внимание реакция парных глаз, в слёзной жидкости которых происходили такие же изменения уровня  $\alpha_2$ -МГ и ЭТ-1, как в опытных глазах. Существование межocularных взаимодействий хорошо известно, но пока мало изучено. Реакция парного глаза на пересадку ИПСК-РПЭ согласуется с данными Taylor и соавт. о том, что потеря иммунной привилегии субретинального пространства (которую обеспечивает как раз пигментный эпителий) при лазерном воздействии на сетчатку одного глаза вызывает то же явление в парном глазу [1].

Поскольку изменения, наблюдаемые в слёзной жидкости в течение первого месяца после введения ИПСК-РПЭ, могут быть следствием хирургической травмы, связанной с инъекцией клеток, а также результатом проводимой в этот период медикаментозной терапии, нами были проведены эксперименты по проверке этих предположений.

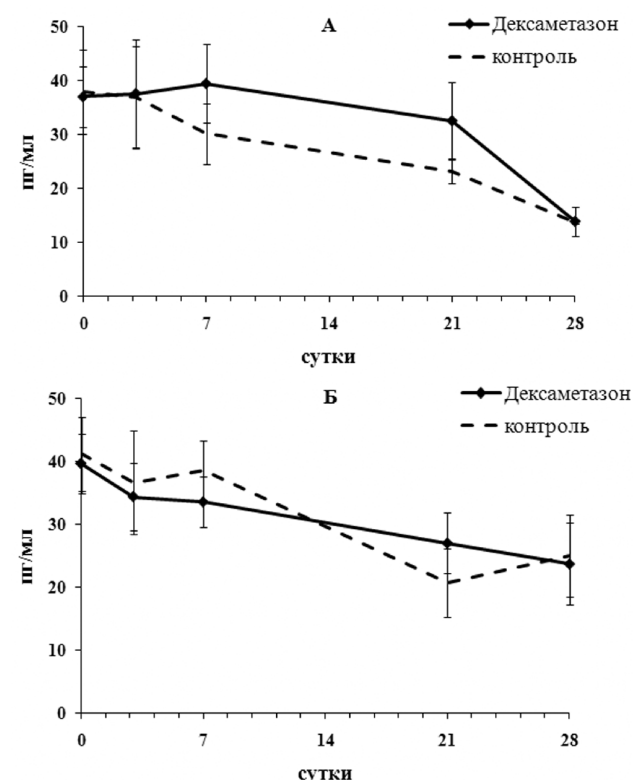


**Рисунок 6.** Активность  $\alpha_2$ -МГ (нмоль/мин·мл) в слёзной жидкости кроликов после интравитреального введения физиологического раствора (а) и кеналага (б). В опытный глаз инстиллировали дексаметазон 0,1% (5 дней, 3 раза в день), в контрольный – физраствор. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  стандартная ошибка среднего. \* –  $p < 0,05$  по сравнению с исходным уровнем.

Интравитреальное введение физиологического раствора как с последующими инстилляциями дексаметазона, так и без них не вызвало изменения активности  $\alpha_2$ -МГ в слёзной жидкости. В то же время интравитреальное введение кеналага привело к увеличению активности  $\alpha_2$ -МГ в слезе ( $p < 0,01$  на 21 сутки по сравнению с исходным уровнем), которое усиливалось при добавлении инстилляций дексаметазона ( $p < 0,05$  на 14 сутки по сравнению с исходным уровнем) (рис. 6).

Эти результаты позволяют утверждать, что травматическое повреждение, вызванное процедурой инъекции, не оказывает влияния на уровень  $\alpha_2$ -МГ в слёзной жидкости, и, в основном, увеличение её после инъекции ИПСК-РПЭ может быть связано с применением кеналага и дексаметазона.

Содержание ЭТ-1 в слёзной жидкости снижалось после инъекции как физиологического раствора, так и кеналага. Добавление инстилляций дексаметазона несколько уменьшило этот эффект (недостоверно) в случае введения физиологического раствора (рис. 7). Однако наблюдаемое нами снижение концентрации ЭТ-1 в слезе после введения ИПСК-РПЭ было более ранним и значительным. Следовательно, снижение содержания ЭТ-1 в слёзной жидкости, скорее всего, вызвано сочетанием нескольких факторов: воздействием инъекционной травмы, инстилляциями кортикостероидов и введением ксенотенного ИПСК-РПЭ.



**Рисунок 7.** Концентрация эндотелина-1 (пг/мл) в слёзной жидкости кроликов после интравитреального введения физиологического раствора (а) и кеналага (б). В опытный глаз инстиллировали дексаметазон 0,1% (5 дней, 3 раза в день), в контрольный – физраствор. Данные представлены в виде среднего арифметического  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

Таким образом, после трансплантации ИПСК-РПЭ в область атрофии РПЭ кроликов в слёзной жидкости происходит изменение активности  $\alpha_2$ -МГ и содержания ЭТ-1 в зависимости от стадии процесса и проводимой терапии. Известно, что  $\alpha_2$ -МГ не может поступать в тканевые жидкости из кровеносных сосудов вследствие своей высокой молекулярной массы и синтезируется местно [21]. Концентрация ЭТ-1 в слезе выше, чем в плазме крови. Предполагается, что ЭТ-1 секретируют слёзные железы [22]. Следовательно, на уровень  $\alpha_2$ -МГ и ЭТ-1 в слёзной жидкости оказывают влияние местные факторы.

Повышение активности  $\alpha_2$ -МГ в слезе в течение первых трёх недель после введения ИПСК-РПЭ, как было показано нами, обусловлено применением кортикостероидной терапии в ранние сроки. Увеличение продукции  $\alpha_2$ -МГ под влиянием кортикостероидов выявлено в экспериментах на культурах клеток [23, 24]. Возможно, увеличение продукции  $\alpha_2$ -МГ является одним из механизмов противовоспалительного действия глюкокортикоидов. Учитывая, что активность  $\alpha_2$ -МГ в слезе увеличивается при деструктивных процессах в сетчатке [12], повышение активности  $\alpha_2$ -МГ в слезе через 2-3 месяца после трансплантации, когда медикаментозная терапия уже не проводилась, можно расценивать как отражение реакции на введение клеток. Причём при введении клеток на подложке это повышение в среднем было почти вдвое больше, чем при введении клеточной суспензии, что соответствует данным ОКТ.

Падение содержание ЭТ-1 в слёзной жидкости в течение первых трёх недель после введения ИПСК-РПЭ, по-видимому, вызвано сочетанием влияния процедуры введения клеток и действия кортикостероидных препаратов. На примере культуры клеток эпителия лёгких человека показано, что дексаметазон и триамцинолон снижают синтез и высвобождение ЭТ-1 [25]. Не исключено, что уменьшение содержания ЭТ-1 в слёзной жидкости может быть вызвано также увеличением продукции свободных радикалов в этот период, что приводит к снижению активности эндотелин-превращающего фермента, осуществляющего синтез ЭТ-1 [26]. Снижение уровня сильнейшего вазоконстриктора ЭТ-1 может способствовать усилению местного кровотока и увеличению перфузии повреждённых тканей.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Несмотря на то, что субретинальное пространство обладает защитой от развития иммуногенного воспаления, трансплантация ИПСК-РПЭ может вызывать иммунные реакции, приводящие к воспалению и повреждению тканей, ограничивающих субретинальное пространство, и к утрате пересаженных клеток [27]. Поэтому при разработке протоколов медикаментозного сопровождения при трансплантации РПЭ важно оценивать характер изменения локальных метаболических процессов. Полученные данные дают основание полагать, что исследование состава слезы, в частности

определение уровня  $\alpha_2$ -МГ и ЭТ-1, может быть использовано в качестве неинвазивного метода мониторинга посттрансплантационного процесса при пересадке клеток РПЭ для раннего прогнозирования развития осложнений и персонализированного выбора методов медикаментозной коррекции.

## **ФИНАНСИРОВАНИЕ**

Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России (Пер. №НИОКТР АААА-А21-121011190051-2) и государственного задания ФМБА России по теме “Органоид хряща и глаза (Органоид-2)”.

## **СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ**

Все эксперименты с животными проведены в соответствии с рекомендациями “Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research” of The Association for Research in Vision and Ophthalmology (“ARVO”). Протокол настоящего исследования был утверждён Комитетом по этике НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава России (выписка 53/1 из протокола заседания Комитета по этике №53 от 08.04.2021).

## **КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## **ЛИТЕРАТУРА**

1. Taylor A.W., Hsu S., Ng T.F. (2021) The role of retinal pigment epithelial cells in regulation of macrophages/microglial cells in retinal immunobiology. *Front. Immunol.*, **12**, 724601. DOI: 10.3389/fimmu.2021.724601
2. Ивахненко О.И., Нероев В.В., Зайцева О.В. (2021) Возрастная макулярная дегенерация и диабетическое поражение глаз. Социально-экономические аспекты заболеваемости. *Вестник офтальмологии*, **137**(1), 123-129. [Ivakhnenko O.I., Neroev V.V., Zaytseva O.V. (2021) Age-related macular degeneration and diabetic eye lesion. Socio-economic aspects. *Vestnik Oftalmologii*, **137**(1), 123-129.] DOI: 10.17116/oftalma2021137011123
3. Харитонов А.Е., Сурдина А.В., Лебедева О.С., Богомазова А.Н., Лагарькова М.А. (2018) Возможности использования плюрипотентных стволовых клеток для восстановления поврежденного пигментного эпителия сетчатки глаза. *Acta Naturae*, **10**(3), 30-39. [Kharitonov A.E., Surдина A.V., Lebedeva O.S., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A. (2018) Possibilities for using pluripotent stem cells for restoring damaged eye retinal pigment epithelium. *Acta Naturae*, **10**(3), 30-39.] DOI: 10.32607/20758251-2018-10-3-30-39
4. Ahmed I., Johnston R.J., Singh M.S. (2021) Pluripotent stem cell therapy for retinal diseases. *Ann. Translational Med.*, **9**(15), 1279. DOI: 10.21037/atm-20-4747
5. Sharma R., Khristov V., Rising A., Jha B.S., Dejene R., Hotaling N., Li Y., Stoddard J., Stankewicz C., Wan Q. (2019) Clinical-grade stem cell-derived retinal pigment epithelium patch rescues retinal degeneration in rodents and pigs.



- Science Translational Medicine, **11**, 475.  
DOI: 10.1126/scitranslmed.aat5580
6. Sugita S., Futatsugi Y., Ishida M., Edo A., Takahashi M. (2020) Retinal pigment epithelial cells derived from induced pluripotent stem (iPS) cells suppress or activate T cells via costimulatory signals. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(18), 6507. DOI: 10.3390/ijms21186507
7. Rajendran Nair D.S., Zhu D., Sharma R., Martinez Camarillo J.C., Bharti K., Hinton D.R., Humayun M.S., Thomas B.B. (2021) Long-term transplant effects of iPSC-RPE monolayer in immunodeficient RCS rats. *Cells*, **10**(11), 2951. DOI: 10.3390/cells10112951
8. Sugita S., Mandai M., Kamao H., Takahashi M. (2021) Immunological aspects of RPE cell transplantation. *Prog. Retin. Eye Res.*, **84**, 100950. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2021.100950
9. Fujii S., Sugita S., Futatsugi Y., Ishida M., Edo A., Makabe K., Kamao H., Iwasaki Y., Sakaguchi H., Hirami Y., Kurimoto Y., Takahashi M. (2020) A strategy for personalized treatment of iPSC-retinal immune rejections assessed in cynomolgus monkey models. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(9), 3077. DOI: 10.3390/ijms21093077
10. Petrash C.C., Palestine A.G., Canto-Soler M.V. (2021) Immunologic rejection of transplanted retinal pigmented epithelium: Mechanisms and strategies for prevention. *Front. Immunol.*, **12**, 621007. DOI: 10.3389/fimmu.2021.621007
11. Павленко Т.А., Ким А.Р., Курина А.Ю., Давыдова Н.Г., Коломойцева Е.М., Чеснокова Н.Б., Угрюмов М.В. (2018) Эндотелины и дофамин в слезной жидкости в оценке нейроваскулярных нарушений при глаукоме. *Вестник офтальмологии*, **134**(4), 41-46. [Pavlenko T.A., Kim A.R., Kurina A.Yu., Davydova N.G., Kolomojceva E.M., Chesnokova N.B., Ugriumov M.V. (2018) Endothelins and dopamine levels in tears for assessment of neurovascular disorders in glaucoma. *Vestnik Oftalmologii*, **134**(4), 41-46.] DOI: 10.17116/oftalma201813404141
12. Нероева Н.В., Нероев В.В., Чеснокова Н.Б., Катаргина Л.А., Павленко Т.А., Безнос О.В., Илюхин П.А., Уткина О.А. (2022) Способ выявления активного деструктивного процесса в сетчатке в эксперименте, №2768588 от 24.03.2022. Москва, Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. [Neroeva N.V., Neroev V.V., Chesnokova N.B., Katargina L.A., Pavlenko T.A., Beznos O.V., Ilyukhin P.A., Utkina O.A. (2022) Method of revealing of the active experimental destructive process in retina. Russian State Patent Agency Certificate, №2768588 of 24.03.2022.]
13. Cater J.H., Wilson M.R., Wyatt A.R. (2019) Alpha-2-macroglobulin, a hypochlorite-regulated chaperone and immune system modulator. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 5410657. DOI: 10.1155/2019/5410657
14. Чеснокова Н.Б., Павленко Т.А., Безнос О.В., Григорьев А.В. (2020) Роль эндотелиновой системы в патогенезе глазных заболеваний. *Вестник Офтальмологии*, **136**(1), 117-123. [Chesnokova N.B., Pavlenko T.A., Beznos O.V., Grigoryev A.V. (2020) The role of the endothelin system in the pathogenesis of eye diseases. *Vestnik Oftalmologii*, **136**(1), 117-123.] DOI: 10.17116/oftalma202013601117
15. Bhogal R.H., Mirza D.F., Afford S.C., Mergental H. (2020) Biomarkers of liver injury during transplantation in an era of machine perfusion. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(5), 1578. DOI: 10.3390/ijms21051578
16. Нероева Н.В., Нероев В.В., Илюхин П.А., Кармокова А.Г., Лосанова О.А., Рябина М.В., Майбогин А.М. (2020) Моделирование атрофии ретинального пигментного эпителия. *Российский офтальмологический журнал*, **13**(4), 58-63. [Neroeva N.V., Neroev V.V., Ilyukhin P.A., Karmokova A.G., Losanova O.A., Ryabina M.V., Maybogin A.M. (2020) Modeling the atrophy of retinal pigment epithelium. *Russian Ophthalmological Journal*, **13**(4), 58-63.] DOI: 10.21516/2072-0076-2020-13-4-58-63
17. Нероева Н.В., Нероев В.В., Илюхин П.А., Кармокова А.Г., Лосанова О.А., Рябина М.В., Майбогин А.М. (2019) Способ моделирования атрофии ретинального пигментного эпителия. № 2709247 от 26.08.2019. Москва, Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. [Neroeva N.V., Neroev V.V., Ilyukhin P.A., Karmokova A.G., Losanova O.A., Ryabina M.V., Maybogin A.M. (2019) Method of simulating retinal pigment epithelium atrophy. Russian State Patent Agency Certificate, No. 2709247 of 26.08.2019.]
18. Surdina A., Lebedeva O., Chernonosova V., Zhukova J., Kharitonov A., Bogomazov B., Kiselev S., Laktionov P., Lagarkova M. (2017) Obtaining polarized functional retinal pigment epithelium from iPSC on substrates mimicking the Bruch's membrane. *FEBS J.*, **284**(Suppl. 1), 377. DOI: 10.1111/febs.14174
19. Нероева Н.В., Нероев В.В., Катаргина Л.А., Рябина М.В., Илюхин П.А., Кармокова А.Г., Лосанова О.А., Майбогин А.М., Лагарькова М.А., Еремеев А.В., Харитонов А.Е. (2019) Способ субретинальной трансплантации клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ), дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, при атрофии ретинального пигментного эпителия в эксперименте. № 2729937 от 15.11/2019. Москва, Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. [Neroeva N.V., Neroev V.V., Katargina L.A., Ryabina M.V., Ilyukhin P.A., Karmokova A.G., Losanova O.A., Majbogin A.M., Lagarkova M.A., Yermeev A.V., Kharitonov A.E. (2019) Method of subretinal transplantation of retinal pigment epithelium (RPE) cells differentiated from human induced pluripotent stem cells, with atrophy of retinal pigment epithelium in experiment. Russian State Patent Agency Certificate, No. 2729937 of 15.11.2019.]
20. Chuang W.H., Liu P.C., Hung C.Y., Lee K.K. (2014) Purification, characterization and molecular cloning of alpha-2-macroglobulin in cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish and Shellfish Immunology*, **41**(2), 346-355. DOI: 10.1016/j.fsi.2014.09.016
21. Garcia-Ferrer I., Marrero A., Gomis-Rüth F.X., Goulas T. (2017)  $\alpha_2$ -Macroglobulins: Structure and function. *Subcellular Biochem.*, **83**, 149-183. DOI: 10.1007/978-3-319-46503-6\_6
22. Takashima Y., Takagi H., Takahashi M., Reinach P.S., Mircheff A.K., Warren D.W., Yoshimura N. (1996) Endothelin protein expression in tear glands of the rabbit. *Curr. Eye Res.*, **15**(7), 768-773. DOI: 10.3109/02713689609003461
23. Gross V., Andus T., Tran-Thi T.A., Bauer J., Decker K., Heinrich P.C. (1984) Induction of acute phase proteins by dexamethasone in rat hepatocyte primary cultures. *Exper. Cell Res.*, **151**(1), 46-54. PMID: 6199220 DOI: 10.1016/0014-4827(84)90354-9.
24. Ramadori G., Knittel T., Schwöglers S., Bieber F., Rieder H., Meyer zum Büschenfelde K.H. (1991) Dexamethasone modulates alpha 2-macroglobulin and apolipoprotein E gene expression in cultured rat liver fat-storing (Ito) cells. *Hepatology*, **14**(5), 875-882. DOI: 10.1002/hep.1840140520



25. Calderón E., Gómez-Sánchez C.E., Cozza E.N., Zhou M., Coffey R.G., Lockey R.F., Prockop L.D., Szentivanyi A. (1994) Modulation of endothelin-1 production by a pulmonary epithelial cell line. I. Regulation by glucocorticoids. *Biochem. Pharmacol.*, **48**(11), 2065-2071. DOI: 10.1016/0006-2952(94)90506-1
26. López-Ongil S., Senchak V., Saura M., Zaragoza C., Ames M., Ballermann B., Rodríguez-Puyol M., Rodríguez-Puyol D., Lowenstein C.J. (2000) Superoxide regulation of endothelin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, **275**(34), 26423-26427. DOI: 10.1074/jbc.M000767200
27. Fujii S., Sugita S., Futatsugi Y., Ishida M., Edo A., Makabe K., Kamao H., Iwasaki Y., Sakaguchi H., Hirami Y., Kurimoto Y., Takahashi M. (2020) A strategy for personalized treatment of iPS-retinal immune rejections assessed in cynomolgus monkey models. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(9), 3077. DOI: 10.3390/ijms21093077

Поступила в редакцию: 27. 06. 2022.  
После доработки: 28. 10. 2022.  
Принята к печати: 28. 10. 2022.

**CHANGES OF  $\alpha_2$ -MACROGLOBULIN ACTIVITY AND ENDOTHELIN-1 CONCENTRATION IN TEARS OF RABBITS AFTER TRANSPLANTATION OF RETINAL PIGMENT EPITHELIUM CELLS DERIVED FROM THE INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS**

*N.V. Neroeva<sup>1</sup>, V.V. Neroev<sup>1</sup>, N.B. Chesnokova<sup>1\*</sup>, L.A. Katargina<sup>1</sup>, T.A. Pavlenko<sup>1</sup>, O.V. Beznos<sup>1</sup>, P.A. Ilyukhin<sup>1</sup>, O.A. Utkina<sup>1</sup>, M.A. Lagarkova<sup>2</sup>, P.P. Laktionov<sup>3</sup>, A.N. Bogomazova<sup>2</sup>, A.E. Kharitonov<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Helmholtz National Medical Research Center of Eye Diseases,  
14/19 Sadovaya-Chernogriazskaya str., Moscow, 105062 Russia; \*e-mail: nchesnokova2012@yandex.ru

<sup>2</sup>Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine,  
1a Malaya Pirogovskaya str., Moscow, 119435 Russia

<sup>3</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,  
8 Acad. Lavrentiev ave., Novosibirsk, 630090 Russia

Retinal diseases accompanied with the dysfunction or death of the retinal pigment epithelial (RPE) cells are widespread, hard to treat, and appear to be a leading case of visual loss and blindness among the persons older than 55 years. Transplantation of RPE cells derived from the induced pluripotent stem cells (IPSC-RPE) is a promising method of therapy for these diseases. To ensure the transplant survival instant follow-up is required. It can be based on biochemical analyses of tear fluid that can be easily non-invasively collected. For the post-transplantation process monitoring we have chosen such polyfunctional bioregulators as  $\alpha_2$ -macroglobulin ( $\alpha_2$ -MG) and endothelin-1 (ET-1). RPE atrophy in New Zealand Albino rabbits was modeled via the subretinal injection of bevacizumab. IPSC-RPE in suspension or as a monolayer on the scaffold were transplanted subretinally 1 month after the injection.  $\alpha_2$ -MG activity and ET-1 concentration in tears were estimated during the first month and after 2, 3 and 7 months after transplantation. On the 7-14 days after transplantation  $\alpha_2$ -MG activity increased in tears of the both operated and controlateral eye probably as a reaction on the corticosteroid therapy. In 50% rabbits there was one more increase after 2-3 months that could be due to the immune inflammation. Concentration of ET-1 in tears decreased dramatically on the 7-14 days and 7 months after transplantation, and it could have an influence upon the retinal vassal tone. The data obtained show that estimation of bioregulators in tears can help monitoring local metabolic processes after RPE transplantation that is necessary for the opportune, reasonable and focused medicamental correction of post-transplantation process.

**Key words:** induced pluripotent stem cells; retinal pigment epithelium; transplantation; tears;  $\alpha_2$ -macroglobulin; endothelin-1; optical coherent tomography

**Funding.** This research was financed by the State Assignments of Ministry of Health of the Russian Federation and Federal Medical Biological Agency.

Received: 27.06.2022; revised: 28.10.2022; accepted: 28.10.2022.