

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ИПСК В ПРЕДШЕСТВЕННИКИ ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ В ТРЕХМЕРНЫХ УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Е. Б. Жигмитова¹, А. В. Косых¹, Н. Г. Гурская^{1,2} ✉

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

² Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

Заболевания, связанные с дефицитом лимбальных стволовых клеток (хронические эрозии, рубцевание роговицы), требуют новых подходов регенеративной медицины. Цель исследования — разработать протокол получения клеток-предшественников эпителия лимба и роговицы из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК). Использовали метод дифференцировки иПСК в направлении органоида глаза для получения трехмерных гетерогенных структур за три недели. Полученные органоиды содержат клетки-предшественники эпителия роговицы, экспрессирующие кератин 3 и коллаген 7, что подтверждает возможность генерации функционального эпителия *in vitro*. Протокол позволяет создавать изогенные пациент-специфичные линии для терапии лимбальной недостаточности и дистрофического буллезного эпидермолиза, в том числе после предварительного редактирования генома иПСК.

Ключевые слова: иПСК, сфероид, дифференцировка, органоид глаза, эпителий, лимб, роговица, коллаген 7

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта Министерства здравоохранения РФ, проект №124021000001-09.

Благодарности: члену-корреспонденту РАН, профессору М. А. Лагарьковой за обсуждение работы, плодотворную дискуссию и критические замечания.

Вклад авторов: Е. Б. Жигмитова — дизайн и проведение эксперимента; А. В. Косых — обработка материала, микросъемка и подготовка статьи; Н. Г. Гурская — концепция, дизайн работы, редактирование первичной рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Надежда Георгиевна Гурская
ул. Островитянова, д. 1, стр. 1, г. Москва, 117997, Россия; ngurskaya@mail.ru

Статья получена: 25.11.2025 **Статья принята к печати:** 12.12.2025 **Опубликована онлайн:** 27.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.070

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

DIFFERENTIATION OF IPSCS INTO CORNEAL EPITHELIAL PRECURSORS IN THREE-DIMENSIONAL *IN VITRO* CULTURE

Zhigmitova EB¹, Kosykh AV¹, Gurskaya NG^{1,2} ✉

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia.

² Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

Diseases associated with limbal stem cell deficiency, such as chronic epithelial erosion and corneal scarring, require new therapeutic approaches rooted in regenerative medicine. This study aimed to develop a protocol for obtaining progenitor cells of the epithelium of the limb and cornea from induced pluripotent stem cells (iPSCs). We differentiated iPSCs toward eye organoids to obtain three-dimensional heterogeneous structures within three weeks. The resulting organoids contain corneal epithelial progenitor cells expressing keratin 3 and collagen 7, which confirms the possibility of generating functional epithelium *in vitro*. The protocol enables the generation of isogenic, patient-specific cell lines for treating limbal insufficiency and dystrophic epidermolysis bullosa, including applications following preliminary genome editing of iPSCs.

Keywords: IPSC, spheroid, differentiation, eye organoid, epithelium, limbus, cornea, collagen 7

Funding: the work was supported by a grant from the Ministry of Health of the Russian Federation, project No. 124021000001-09.

Acknowledgements: the authors thank M. A. Lagarkova, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor, for fruitful discussion of the work and critical comments.

Author contribution: Zhigmitova EB — design and conduct of the experiment, Kosykh AV — material processing, micrography, preparation of the article, Gurskaya NG — concept, design of the work, primary manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Nadezhda G. Gurskaya
Ostrovityanova, 1, str. 1, Moscow, 117997, Russia; ngurskaya@mail.ru

Received: 25.11.2025 **Accepted:** 12.12.2025 **Published online:** 27.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.070

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Слепота и нарушение зрения — глобальная проблема здравоохранения, затрагивающая, по данным ВОЗ, как минимум 2,2 млрд человек в мире, среди которых у 6,17 млн тяжелые нарушения зрения вызваны патологиями роговицы [1]. Трансплантация роговицы (кератопластика) восстанавливает зрение при ее тяжелых заболеваниях путем замены поврежденного участка донорским трансплантатом. Данный вид трансплантации,

выполняемый более 180 000 раз в год, считается самым распространенным и одним из самых успешных в этой области [2]. Однако потребность в донорской роговице намного превышает ее доступное количество, особенно в странах с ограниченными ресурсами. Это побуждает научное сообщество искать альтернативные решения аллотрансплантации роговицы, от использования децеллюляризованных ксенотрансплантатов роговицы до

внедрения методов тканевой инженерии и регенеративной медицины с использованием дифференцированных стволовых клеток [3, 4].

Глаз — это сложный орган, состоящий из высокоспециализированных тканей, происходящих из разных зачатков [5]. Сетчатка развивается из нейроэктодермы через зрительный пузырь, эпителий роговицы происходит от поверхностной эктодермы, а радужная оболочка и строма роговицы имеют происхождение от нервного гребня. Развитие методов дифференцировки из стволовых клеток в специализированные клетки глаза также способствует созданию перспективного ресурса для новых исследований морфогенеза и развития глаз.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки человека (иПСК) являются уникальной моделью, позволяющей использовать преимущества регенеративной медицины. По свойствам иПСК схожи с эмбриональными стволовыми клетками и способны дифференцироваться в самые различные типы клеток. Разнообразны методы получения иПСК и источники соматических клеток для их репрограммирования (от кератиноцитов и дермальных фибробластов, получаемых в ходе биопсии кожи, до мононуклеарных клеток периферической крови или клеток мочи доноров) для получения в конечном счете аутологичного материала.

Протоколы дифференцировки из иПСК условно можно подразделить на две группы — с использованием стандартных протоколов ведения клеточных культур в виде суспензии и с использованием трехмерных моделей [6, 7].

Согласно прогнозу [8], в последние годы значительно выросло количество клинических исследований, посвященных использованию трансплантаций пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), полученного в результате дифференцировки иПСК. Сетчатка млекопитающих во взрослом возрасте лишена значительного регенеративного потенциала, самопроизвольного восстановления функции при дегенеративных процессах не происходит. Врожденные и приобретенные дегенеративные заболевания сетчатки сопровождаются утратой фоторецепторов в ней, что приводит к тяжелой и необратимой потере зрения. На фоне значительного прогресса в понимании патогенеза дегенеративных заболеваний сетчатки ключевое значение приобретает разработка методов генерации клеток (ПЭС) из клеток-предшественников. Перспективными источниками являются аллогенные клетки и аутологичные, получаемые из пациент-специфичных клеток-предшественников ПЭС, способные потенциально компенсировать функциональные дефекты [6].

В отличие от сетчатки, передний эпителий роговицы взрослого организма способен к репаративной регенерации, хотя скорость и тип замещающей ткани зависят от выраженности травматических повреждений. При глубоких дефектах поражается не только эпителий, но и Боуменова мембрана, состоящая из коллагеновых волокон, и лежащая ниже часть стромы роговицы. В процессе репарации поражений происходит размножение эпителия, покрывающего раневой дефект, при этом часто формируется более толстый эпителиальный пласт, чем в норме. Дефекты нижележащих слоев замещаются фиброзной тканью грубоволокнистого (рубцового) содержания [9]. Помимо травмы различные заболевания и генетические нарушения могут привести к повреждению и дегенеративным изменениям роговицы. Среди заболеваний, влияющих на функционирование лимба и роговицы, выделяется синдром лимбальной

недостаточности (СЛН), буллезная кератинопатия (эндотелиально-эпителиальная дистрофия роговицы), а также симблефарон, при котором сращивание конъюнктивы стекловидного тела с внутренней поверхности века приводит к рубцовому перерождению роговицы. Так, например, офтальмологические осложнения распространены у пациентов с буллезным эпидермолизом (БЭ) в целом, но частота их возникновения значительно варьируется в зависимости от подтипа заболевания. Наиболее тяжелые проявления наблюдаются при рецессивном дистрофическом (РДБЭ) и пограничном подтипах. В результате нарушения синтеза коллагена VII типа у пациентов с РДБЭ помимо прочего возникают повторяющиеся эрозии роговицы, пузыри, рубцы, что приводит к таким осложнениям, как экспозиционный кератит и симблефарон [10].

Цель нашего исследования — разработка протокола, совмещающего преимущества различных подходов к получению органоида глаза и эпителия роговицы, в частности, путем культивирования дифференцируемых клеток в виде трехмерной модели.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуральная работа

иПСК (KYOU-DXR0109B) культивировали при 37 °C (5% CO₂) в среде mTESR (85850, STEMCELL Technologies Inc., Канада) на пластиковых чашках Петри, покрытых матригелем (356234, Corning, США). Для получения отдельных колоний иПСК высаживали по 3800 кл./см², и через 5 суток собирали сформированные колонии иПСК после обработки 0,4 мг/мл диспазой (17105041, Gibco, Thermo Fisher Scientific, США), позволяющей открепить колонии от пластика без диссоциации на отдельные клетки.

Для последующего культивирования неадгезивных культур использовали Ultra low attachment чашки Петри (3261, Corning, США).

Переход между разными типами культуральных сред всегда осуществляли поэтапно в течение 4–5 дней по схеме:

- 1-й день: –1 мл/+1 мл;
- 2-й день: –1,5 мл/+1,5 мл;
- 3-й день: –2 мл/+2 мл и т. д.,

где «–» обозначает отбираемый объем текущей культуральной среды, а «+» — добавленный объем дифференцировочной среды следующей стадии.

Среда для эмбрионных тел (ЭТ) состояла из DMEM/F12 (C470п, «ПанЭко»; Россия) с добавлением 20% FBS (F800820, GlobeKang, Китай), 100 мкМ β-меркаптоэтанол (21985023, Thermo Fisher Scientific, США), 100 мкМ MEM NEAA (Ф115/100, «ПанЭко», Россия), 1 мМ Пируват натрия (11360070, Thermo Fisher Scientific, США), 50 ед./мл раствора пенициллин-стрептомицина (15140122, Thermo Fisher Scientific, США) и 2 мМ GlutaMAX (35050061, Thermo Fisher Scientific, США) [11].

Среда XF-KO-SR (Xeno-free KnockOut Serum media) включала в себя DMEM (C455п, «ПанЭко», Россия) с 15% KnockOut SR XenoFree CTS (12618012, Thermo Fisher Scientific, США), 100 мкМ β-меркаптоэтанол (21985023, Thermo Fisher Scientific, США), 100 мкМ MEM NEAA (Ф115/100, «ПанЭко», Россия), 2 мМ GlutaMAX (35050061, Thermo Fisher Scientific, США), 50 ед./мл раствора пенициллин-стрептомицина (15140122, Thermo Fisher Scientific, США) и 10 мкМ ROCK inhibitor (ab120129, abcam, США) [12].

На последующих этапах протокола дифференцировки в среду XF-KO-SR дополнительно вносили 50 нг/мл Noggin4 (PSG100-10, SciStore, Россия), 50 нг/мл bFGF (PSG060-10, SciStore, Россия) и затем 25 нг/мл BMP4 (PCH9534, Thermo Fisher Scientific, США).

Среда hCEpCs (Human Corneal Epithelial Cells media) включала в себя DMEM/F12 (C470п, «ПанЭко», Россия) с 10% KnockOut SR XenoFree CTS (12618012, Thermo Fisher Scientific, США), 2 mM GlutaMAX (35050061, Thermo Fisher Scientific, США), 10 мкМ ROCK inhibitor (ab120129, abcam, США), 0,4 мкг/мл Hydrocortisone (H0888, Sigma-Aldrich, США), 5 мкг/мл Insulin (Ф062, «ПанЭко», Россия), 1,4 нг/мл 3,3',5-Triiodo-L-thyronine (100-0548, STEMCELL Technologies Inc, Канада), 24 мкг/мл Аденин сульфат (A0013500100, SUVCHEM, Индия), 10 мкМ Forskolin (F6886, Sigma-Aldrich, США), 10 нг/мл EGF (PSG130, SciStore, Россия), 10 нг/мл KGF (PSG230-10, SciStore, Россия) и 50 ед./мл раствора пенициллин-стрептомицина (15140122, Thermo Fisher Scientific, США) [13].

Состав указанных сред был разработан на основании приведенных литературных источников с частичными модификациями в связи с недоступностью ряда компонентов. Замену производили исходя из аналогичных механизмов воздействия веществ по литературным данным.

Фотографии цельных органоидов были получены с использованием стереомикроскопа Leica M205.

Гистологическое исследование

Органоиды фиксировали в 10%-м растворе забуференного формалина (00020709, Histoline, Россия) в течение 30 мин, отмывали от фиксатора в DPBS (P060п-1, «ПанЭко», Россия), инкубировали по 1 ч в растворах сахарозы (170764, «Ленреактив», Россия) в DPBS с последовательным увеличением концентрации (10–20–30%) для предотвращения сильной деформации органоидов. Затем органоиды максимально осушили от раствора и заморозили в жидком азоте в Tissue-Tek O.C.T. Compound (4583, Electron Microscopy Sciences, США).

Срезы толщиной 10 мкм получили при помощи Thermo Scientific Microm HM 525 Cryostat, высушили, дополнительно зафиксировали в 10%-м растворе забуференного формалина (00020709, Histoline, Россия) в течение 15 мин при комнатной температуре, затем отмывали в DPBS трижды в течение 5 мин, после чего последовательно инкубировали 30 мин в 1%-м растворе перекиси водорода (153142, «Ленреактив», Россия) в DPBS и 30 мин в 2,5%-м растворе BSA (A7906, Sigma-Aldrich, США) в DPBS.

Иммуногистохимия

Для последующего иммуногистохимического окрашивания срезы инкубировали ночь при +4 °С с первичными

антителами к кератину 3 (PAA490Hu01, CLOUD-CLONE, США) и коллагену 7 (pA5-18390, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США), разведенными 1 : 100 и 1 : 300 соответственно, в блок-растворе DPBS с 2% BSA (A7906, Sigma-Aldrich, США), 1% Triton X100 (1001776062, Sigma-Aldrich, США) и 1% Tween 20 (P7949, Sigma-Aldrich, США). На следующий день срезы отмывали в DPBS и инкубировали ночь при +4 °С со вторичными антителами к IgG кролика, конъюгированными с Alexa594 (A11012, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США), и IgG козы с Alexa488 (A32814, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США), разведенными 1:1000 в блок-растворе. На следующий день срезы отмывали в DPBS и заключили в среде с защитой от выцветания VectaSHIELD Antifade с DAPI (H-1200-10, Vector Laboratories, США).

Срезы были проанализированы с помощью прямого микроскопа Nikon Eclipse Ni с DS-Ri2 (Nikon Corporation, Япония) и серии изображений были получены с использованием набора оптических фильтров этого микроскопа для детекции эмиссии флуоресценции, изображения были обработаны с помощью пакета программ ImageJ (США) для получения микрофотографий.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Формирование исходных ЭТ проходило в два этапа (рис. 1). На первом этапе с Д(–12) в условиях адгезионной культуры происходило формирование колоний иПСК, которые затем приводили в неадгезивную форму (Д(–7)). Через 7 суток культивирования в неадгезивных условиях происходило созревание ЭТ, колонии приобретали более округлую форму с гладкими краями, после чего переходили к протоколу дифференцировки в эпителиальные клетки роговицы (Д(1)).

С 8 дня протокола дифференцировки в среду XF-KO-SR вводили Noggin4 и bFGF — факторы, блокирующие TGFβ- и Wnt-сигналинг и активирующие FGF-сигналинг для индукции эктодермальной дифференцировки. Дополнительно вводили BMP4, поскольку было показано, что BMP4 способствует дифференцировке иПСК в эпителиальные клетки роговицы [14].

На 13-й день начали поэтапно заменять среду XF-KO-SR на среду для культивирования клеток эпителия роговицы человека (hCEpCs).

К 22-м суткам среди органоидов наблюдались как моносферы (рис. 2А), так и комплексные образования, сформированные, вероятнее всего, несколькими агрегировавшими ЭТ (рис. 2Б, В). Большая часть органоидов становилась оптически полупрозрачной в проходящем свете, однако у ряда объектов наблюдали пигментированные участки (рис. 2).

Для анализа паттернов экспрессии маркеров дифференцировки были получены криосрезы

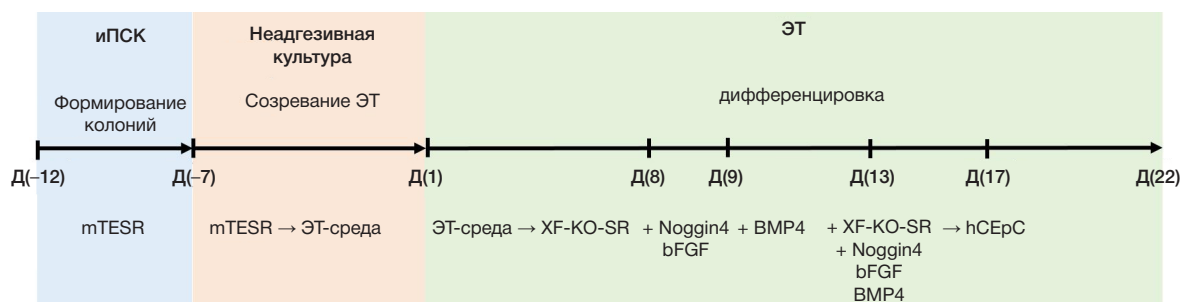


Рис. 1. Протокол получения ЭТ и последующей дифференцировки в эпителиальные клетки роговицы. Д(–12) — начало эксперимента; Д(1) — первый день протокола дифференцировки; Д(22) — последний день дифференцировки, сбор органоидов для последующего анализа

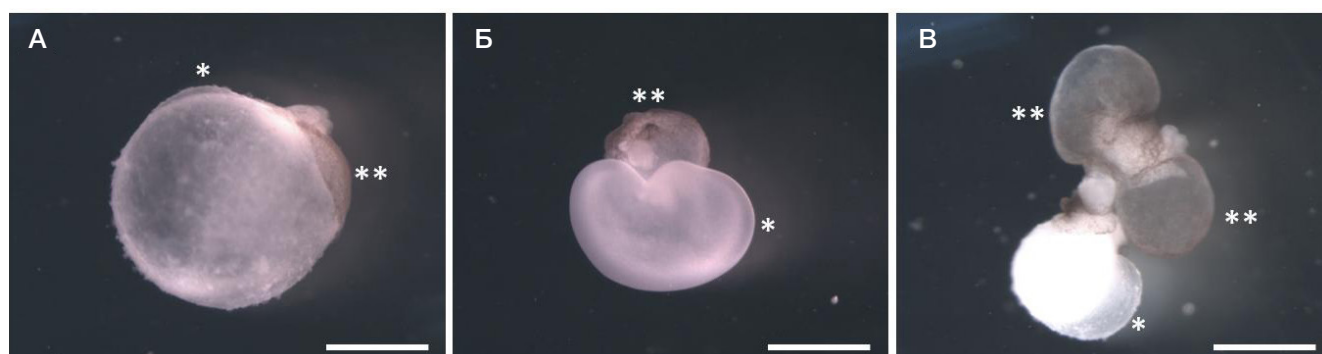


Рис. 2. Темнопольная фотография органоидов на 22-е сутки дифференцировки. Помимо полупрозрачных сфер наблюдаются пигментированные участки органоидов. * — полупрозрачные области на периферии органоида, предположительно участки роговицы; ** — пигментированные области органоида, предположительно соответствующие органоидам пигментного эпителия сетчатки. Масштабный отрезок — 1 мм

сформированных органоидов и проанализированы при помощи иммуногистохимии. Для оценки уровня экспрессии биомаркеров роговицы и конъюнктивы используется иммуноцитохимический анализ на кератины 3, 7 и 19, поскольку в обширном исследовании было показано, что эпителий роговицы в 100% случаев положительно окрашивается на любой из данных маркеров [15].

Эпителий роговицы поддерживается комплексом базальной мембраны, который прикрепляет эпителий к боуеновой мембране посредством сложной сетки из прикрепляющих фибрилл (состоящих из коллагена типа VII) и прикрепляющих бляшек (коллаген типа VI), эти структуры взаимодействуют с плотной пластинкой и коллагеновыми фибриллами боуенова слоя [16].

На рис. 3 представлены фотографии срезов органоидов, представляющих из себя сферу с полупрозрачным содержимым, окаймленным клеточными слоями, с положительным окрашиванием на маркеры эпителиальной дифференцировки (кератин 3) и базальной мембраны (коллаген 7). Клетки, положительно окрашенные на кератин 3, наблюдали на периферии во внешнем клеточном слое органоида. Экспрессия коллагена 7 обнаружена в подлежащих клеточных слоях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Трансплантация роговицы является примером наиболее успешной трансплантации органов человека. Успех и высокая

частота применения ортотопических аллотрансплантатов роговицы как у людей, так и у экспериментальных животных, связаны с феноменом «иммунной привилегии» глаза, ассоциированным с естественным процессом подавления воспалительных процессов для сохранения функции зрения. В настоящее время считается, что три основных механизма обеспечивают иммунную привилегию при трансплантации роговицы: 1) анатомические, клеточные и молекулярные барьеры в роговице; 2) толерантность, связанная с присутствием регуляторных Т-клеток и иммунными отклонениями в передней камере глаза; 3) иммуносупрессорное внутриглазное микроокружение [17].

Мы описываем протокол дифференцировки функционального эпителия роговицы из иПСК человека *in vitro*. При соблюдении этого протокола часть клеток спонтанно образует круглые колонии, сфероиды или эмбриоидные тельца, которые в ходе последовательных стадий дифференцировочного процесса, при котором постепенно меняют культуральную среду и добавляют факторы роста и ингибиторы каскада WNT, постепенно приобретают свойства органоида глаза. Основу нашему протоколу дало использование методики, описанной в статье Isla-Magrané, в которую был внесен ряд изменений [18]. В данной работе использована также трехмерная модель дифференцировки с вынужденной агрегацией ЭТ при культивировании в условиях предотвращающих адгезию клеток к поверхности пластика. К преимуществам данного протокола можно

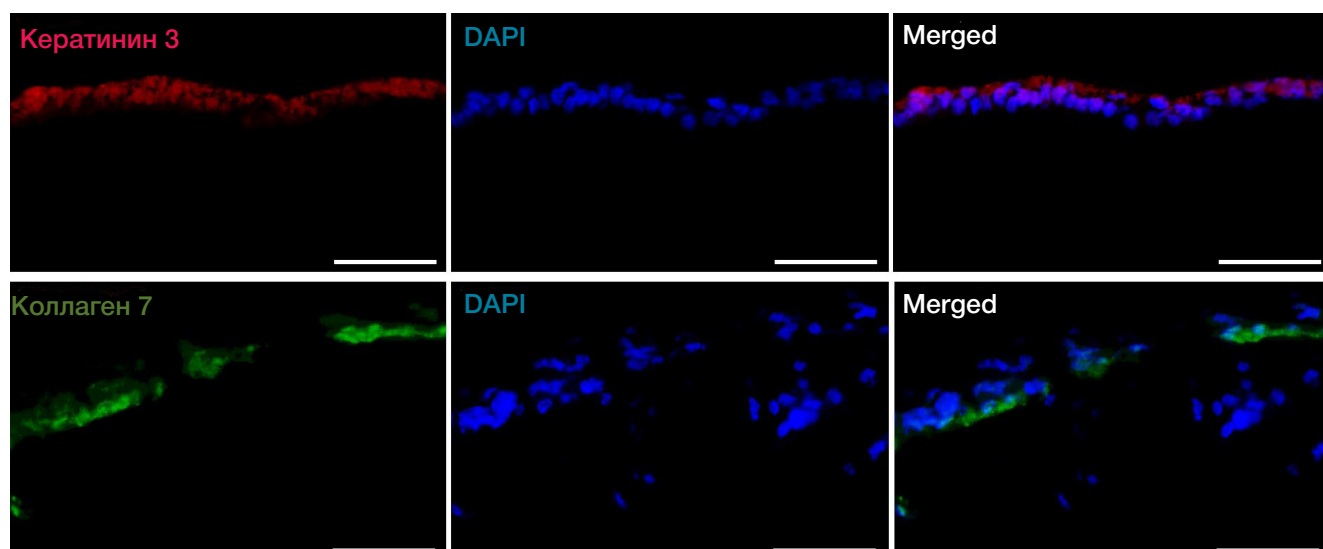


Рис. 3. Иммуногистохимическое окрашивание криосрезов органоидов на 22-е сутки дифференцировки. Реакция с антителами к кератину 3 (красный цвет) и реакция с антителами к коллагену 7 (зеленый цвет). Ядра дополнительно окрашены DAPI. Масштабный отрезок — 50 мкм

отнести возможность сокультивирования клеток различных типов, и получение одиночных трехмерных моделей, размер которых можно контролировать [19]. Агрегация клеток и образование сфероидов происходит за счет способности клеток к межклеточной адгезии, стимулированной отсутствием адгезии клеток к культуральному пластику [20]. Опубликованный здесь протокол дифференцировки потенциально может быть полезен исследователям, интересующимся развитием глаз и/или регенерацией поверхности глаза, специалистам в области трансляционной регенеративной медицины.

Развитие методов направленной дифференцировки iPСК в ПЭС позволило использовать некоторые подходы для получения эпителия лимба и роговицы. Для получения клеток ПЭС из iPСК используют малые молекулы, ингибиторы WNT/ β -катенин каскада или рекомбинантные белки и факторы [22, 23].

При дифференцировке колоний iPСК в адгезивных условиях постепенно формируются концентрические зоны — SEAM (self-earned autonomous multi-zone), клетки в которых начинают приобретать различную морфологию и специфический набор маркеров. Отметим преимущество такого протокола: при таком культивировании клетки одного типа могут быть выделены механическим способом и последующей проточной цитофлуориметрией в популяцию клеток-предшественников, подобных эпителию лимба. Клетки этого типа можно размножить и дифференцировать с образованием эпителиального слоя, экспрессирующего маркеры кератина 3 и 12, PAX6. Исследователи подтвердили функциональность полученных клеток на модели на животных эпителиальной дисфункции роговицы после хирургической ксенотрансплантации. В 2024 г. опубликованы результаты первых успешных клинических исследований по аллогенной трансплантации эпителиальных клеток роговицы, дифференцированных из iPСК по SEAM-протоколу, четырем пациентам. Два пациента страдали синдромом лимбальной недостаточности, один — пемфигоидом слизистой оболочки глаза и один — токсическим эпидермальным некрозом [24]. Во всех случаях после 52 недель наблюдения было отмечено улучшение состояния глаз, увеличение остроты зрения, а также уменьшение помутнения роговицы. Дефекты эпителия роговицы, субъективные симптомы, показатели качества жизни и неоваскуляризация роговицы в основном улучшились или остались без изменений. Никаких серьезных нежелательных явлений, таких как опухолеобразование

или клиническое отторжение, не обнаружено в течение всего периода наблюдения.

Получение органоида глаза из iPСК с помощью разработанного протокола позволило детектировать экспрессию коллагена 7 в области, прилегающей к базальной мембране. Прикрепляющие фибриллы, образуемые коллагеном 7, являются важным структурным элементом, поддерживающим интегральную целостность ткани. Больные, страдающие наследственными нарушениями в экспрессии коллагена 7 (РДБЭ), инвалидизируются с детства за счет хронического воспаления кожи и эпителиальной выстилки внутренних органов. Применяемые в настоящее время клинические методы лечения офтальмологических проявлений, включая использование контактных линз, смазок и антибиотиков для уменьшения симптомов, не предлагают решения для предотвращения образования рубцов на роговице [10].

Для клеточной терапии в таких случаях могут быть применимы аллогенные трансплантации эпителия лимба и роговицы, дифференцированные из iPСК здоровых доноров. Создание банков стволовых клеток с линиями гомозиготных клеток по лейкоцитарному антигену человека (HLA) может обеспечить эффективный и экономически выгодный ресурс для терапии нового типа.

Аутологичное лечение на основе iPСК может быть непомерно дорогостоящим и трудоемким, однако использование пациент-специфических iPСК (РДБЭ-iPСК) и их дифференцировки в органоид глаза создает модели заболевания для тестирования новых лекарств и применения методов генной терапии.

ВЫВОДЫ

Данное исследование описывает протокол получения органоида глаза с сформированным эпителием роговицы путем дифференцировки iPСК. Разработка различных методов получения эпителиальных тканей роговицы и лимба способствует развитию регенеративной медицины в офтальмологии. Хотя единый тип трансплантата роговицы вряд ли станет универсальным решением, сочетание различных подходов может способствовать решению проблемы нехватки донорских роговиц, помочь в разработке биоинженерных матриц, которые можно имплантировать с клетками или без них для стимуляции восстановления и регенерации тканей, а также помочь в разработке методов лечения заболеваний, которые невозможно вылечить с помощью доступных в настоящее время методов.

Литература

1. Porth JM, Deiotte E, Dunn M, Bashshur R. A Review of the Literature on the Global Epidemiology of Corneal Blindness. *Cornea*. 2019; 38 (12): 1602–9.
2. Gain P, Jullienne R, He Z, et al. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol*. 2016; 134 (2): 167–73.
3. Hernández J, Panadero-Medianero C, Arrázola MS, Ahumada M. Mimicking the Physicochemical Properties of the Cornea: A Low-Cost Approximation Using Highly Available Biopolymers. *Polymers (Basel)*. 2024; 16 (8): 1118.
4. Griffith M, Poliseti N, Kuffova L, Gallar J, Forrester J, Vemuganti GK, Fuchsluger TA. Regenerative approaches as alternatives to donor allografting for restoration of corneal function. *Ocul Surf*. 2012; 10 (3): 170–83.
5. Ludwig PE, Lopez MJ, Czyz CN. Embryology, Eye Malformations. [Updated 2023 Apr 3]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan [cited 2025 Nov 19]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482496/#>.
6. Hirami Y, Mandai M, Sugita S, Maeda A, Maeda T, Yamamoto M, et al. Safety and stable survival of stem-cell-derived retinal organoid for 2 years in patients with retinitis pigmentosa. *Cell Stem Cell*. 2023; 30 (12): 1585–1596.
7. Hirayama M, Hatou S, Nomura M, Hokama R, Hirayama OI, Inagaki E, et al. A first-in-human clinical study of an allogenic iPSC-derived corneal endothelial cell substitute transplantation for bullous keratopathy. *Cell Rep Med*. 2025; 6 (1): 101847.
8. Харитонов А. Е., Сурдина А. В., Лебедева О. С., Богомазова А. Н., Лагарькова М. А. Возможности использования плюрипотентных стволовых клеток для восстановления поврежденного

- пигментного эпителия сетчатки глаза. *Acta Naturae*. 2018; 10 (3): 30–39.
9. Chandran C, Santra M, Rubin E, Geary ML, Yam GH. Regenerative Therapy for Corneal Scarring Disorders. *Biomedicines*. 2024; 12 (3): 649.
 10. Tong L, Hodgkins PR, Denyer J, Brosnahan D, Harper J, Russell-Eggitt I, et al. The eye in epidermolysis bullosa. *Br J Ophthalmol*. 1999; 83 (3) :323–6.
 11. Hayashi R, Ishikawa Y, Ito M, Kageyama T, Takashiba K, Fujioka T, et al. Generation of corneal epithelial cells from induced pluripotent stem cells derived from human dermal fibroblast and corneal limbal epithelium. *PLoS One*. 2012; 7 (9): e45435.
 12. Hongisto H, Ilmarinen T, Vattulainen M, Mikhailova A, Skottman H. Xeno- and feeder-free differentiation of human pluripotent stem cells to two distinct ocular epithelial cell types using simple modifications of one method. *Stem Cell Res Ther*. 2017; 8 (1): 291.
 13. Ahmad S, Stewart R, Yung S, Kolli S, Armstrong L, Stojkovic M, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by in vitro replication of the corneal epithelial stem cell niche. *Stem Cells*. 2007; 25 (5): 1145–55.
 14. Lee HS, Mok J, Joo CK. Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4) enhances the differentiation of human induced pluripotent stem cells into limbal progenitor cells. *Curr Issues Mol Biol*. 2021; 43 (3): 2124–34.
 15. Poli M, Burillon C, Auxenfans C, Rovere MR, Damour O. Immunocytochemical Diagnosis of Limbal Stem Cell Deficiency: Comparative Analysis of Current Corneal and Conjunctival Biomarkers. *Cornea*. 2015; 34 (7): 817–23.
 16. Forrester JV, Dick AD, McMenamin PG, Roberts F, Pearlman E, editors. *The Eye*. 2016; p. 1–102.
 17. Hori J, Yamaguchi T, Keino H, Hamrah P, Maruyama K. Immune privilege in corneal transplantation. *Prog Retin Eye Res*. 2019; 72: 100758.
 18. Isla-Magrané H, Veiga A, García-Arumí J, Duarri A. Multiocular organoids from human induced pluripotent stem cells displayed retinal, corneal, and retinal pigment epithelium lineages. *Stem Cell Res Ther*. 2021; 12 (1): 581.
 19. Chen X, Sun G, Tian E, Zhang M, Davtyan H, Beach TG, et al. Modeling Sporadic Alzheimer's Disease in Human Brain Organoids under Serum Exposure. *Adv Sci (Weinh)*. 2021; 8 (18): e2101462.
 20. Sakalem ME, De Sibio MT, da Costa FADS, de Oliveira M. Historical evolution of spheroids and organoids, and possibilities of use in life sciences and medicine. *Biotechnol J*. 2021; 16 (5): e2000463.
 21. Maliszewska-Olejniczak K, Brodaczewska KK, Bielecka ZF, Solarek W, Kornakiewicz A, Szczylak C, Porta C, et al. Development of extracellular matrix supported 3D culture of renal cancer cells and renal cancer stem cells. *Cytotechnology*. 2019; 71 (1): 149–63.
 22. Buchholz DE, Pennington BO, Croze RH, Hinman CR, Coffey PJ, Clegg DO. Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. *Stem Cells Transl Med*. 2013; 2 (5): 384–93.
 23. Zhu J, Reynolds J, Garcia T, Cifuentes H, Chew S, Zeng X, et al. Generation of Transplantable Retinal Photoreceptors from a Current Good Manufacturing Practice-Manufactured Human Induced Pluripotent Stem Cell Line. *Stem Cells Transl Med*. 2018; 7 (2): 210–19.
 24. Soma T, Oie Y, Takayanagi H, Matsubara S, Yamada T, Nomura M, Yoshinaga Y, et al. Induced pluripotent stem-cell-derived corneal epithelium for transplant surgery: a single-arm, open-label, first-in-human interventional study in Japan. *Lancet*. 2024; 404 (10466): 1929–39.

References

1. Porth JM, Deiotte E, Dunn M, Bashshur R. A Review of the Literature on the Global Epidemiology of Corneal Blindness. *Cornea*. 2019; 38 (12): 1602–9.
2. Gain P, Julienne R, He Z, et al. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol*. 2016; 134 (2): 167–73.
3. Hernández J, Panadero-Medianero C, Arrázola MS, Ahumada M. Mimicking the Physicochemical Properties of the Cornea: A Low-Cost Approximation Using Highly Available Biopolymers. *Polymers (Basel)*. 2024; 16 (8): 1118.
4. Griffith M, Poliseti N, Kuffova L, Gallar J, Forrester J, Vemuganti GK, Fuchsluger TA. Regenerative approaches as alternatives to donor allografting for restoration of corneal function. *Ocul Surf*. 2012; 10 (3): 170–83.
5. Ludwig PE, Lopez MJ, Czyz CN. Embryology, Eye Malformations. [Updated 2023 Apr 3]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan [cited 2025 Nov 19]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482496/#>.
6. Hiram Y, Mandai M, Sugita S, Maeda A, Maeda T, Yamamoto M, et al. Safety and stable survival of stem-cell-derived retinal organoid for 2 years in patients with retinitis pigmentosa. *Cell Stem Cell*. 2023; 30 (12): 1585–1596.
7. Hirayama M, Hatou S, Nomura M, Hokama R, Hirayama OI, Inagaki E, et al. A first-in-human clinical study of an allogenic iPSC-derived corneal endothelial cell substitute transplantation for bullous keratopathy. *Cell Rep Med*. 2025; 6 (1): 101847.
8. Haritonov AE, Surdina AV, Lebedeva OS, Bogomazova AN, Lagarkova MA. Vozmozhnosti ispol'zovaniya plyuripotentnykh stvolovykh kletok dlya vosstanovleniya povrezhdennogo pigmentnogo epiteliya setchatki glaza. *Acta Naturae*. 2018; 10 (3): 30–39. Russian.
9. Chandran C, Santra M, Rubin E, Geary ML, Yam GH. Regenerative Therapy for Corneal Scarring Disorders. *Biomedicines*. 2024; 12 (3): 649.
10. Tong L, Hodgkins PR, Denyer J, Brosnahan D, Harper J, Russell-Eggitt I, et al. The eye in epidermolysis bullosa. *Br J Ophthalmol*. 1999; 83 (3) :323–6.
11. Hayashi R, Ishikawa Y, Ito M, Kageyama T, Takashiba K, Fujioka T, et al. Generation of corneal epithelial cells from induced pluripotent stem cells derived from human dermal fibroblast and corneal limbal epithelium. *PLoS One*. 2012; 7 (9): e45435.
12. Hongisto H, Ilmarinen T, Vattulainen M, Mikhailova A, Skottman H. Xeno- and feeder-free differentiation of human pluripotent stem cells to two distinct ocular epithelial cell types using simple modifications of one method. *Stem Cell Res Ther*. 2017; 8 (1): 291.
13. Ahmad S, Stewart R, Yung S, Kolli S, Armstrong L, Stojkovic M, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by in vitro replication of the corneal epithelial stem cell niche. *Stem Cells*. 2007; 25 (5): 1145–55.
14. Lee HS, Mok J, Joo CK. Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4) enhances the differentiation of human induced pluripotent stem cells into limbal progenitor cells. *Curr Issues Mol Biol*. 2021; 43 (3): 2124–34.
15. Poli M, Burillon C, Auxenfans C, Rovere MR, Damour O. Immunocytochemical Diagnosis of Limbal Stem Cell Deficiency: Comparative Analysis of Current Corneal and Conjunctival Biomarkers. *Cornea*. 2015; 34 (7): 817–23.
16. Forrester JV, Dick AD, McMenamin PG, Roberts F, Pearlman E, editors. *The Eye*. 2016; p. 1–102.
17. Hori J, Yamaguchi T, Keino H, Hamrah P, Maruyama K. Immune privilege in corneal transplantation. *Prog Retin Eye Res*. 2019; 72: 100758.
18. Isla-Magrané H, Veiga A, García-Arumí J, Duarri A. Multiocular organoids from human induced pluripotent stem cells displayed retinal, corneal, and retinal pigment epithelium lineages. *Stem Cell Res Ther*. 2021; 12 (1): 581.
19. Chen X, Sun G, Tian E, Zhang M, Davtyan H, Beach TG, et al. Modeling Sporadic Alzheimer's Disease in Human Brain Organoids under Serum Exposure. *Adv Sci (Weinh)*. 2021; 8 (18): e2101462.
20. Sakalem ME, De Sibio MT, da Costa FADS, de Oliveira M. Historical evolution of spheroids and organoids, and possibilities

- of use in life sciences and medicine. *Biotechnol J.* 2021; 16 (5): e2000463.
21. Maliszewska-Olejniczak K, Brodaczewska KK, Bielecka ZF, Solarek W, Kornakiewicz A, Szczylik C, Porta C, et al. Development of extracellular matrix supported 3D culture of renal cancer cells and renal cancer stem cells. *Cytotechnology.* 2019; 71 (1): 149–63.
22. Buchholz DE, Pennington BO, Croze RH, Hinman CR, Coffey PJ, Clegg DO. Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. *Stem Cells Transl Med.* 2013; 2 (5): 384–93.
23. Zhu J, Reynolds J, Garcia T, Cifuentes H, Chew S, Zeng X, et al. Generation of Transplantable Retinal Photoreceptors from a Current Good Manufacturing Practice-Manufactured Human Induced Pluripotent Stem Cell Line. *Stem Cells Transl Med.* 2018; 7 (2): 210–19.
24. Soma T, Oie Y, Takayanagi H, Matsubara S, Yamada T, Nomura M, Yoshinaga Y, et al. Induced pluripotent stem-cell-derived corneal epithelium for transplant surgery: a single-arm, open-label, first-in-human interventional study in Japan. *Lancet.* 2024; 404 (10466): 1929–39.