

УДК 576.53

# Поведение мультипотентных клеток, трансплантированных *in vitro* в поврежденную сетчатку глаза

С. А. Сергеев<sup>1\*</sup>, Ю. В. Храмова<sup>1</sup>, М. Л. Семенова<sup>1</sup>, И. Н. Сабурин<sup>2</sup>, Н. В. Кошелева<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

\*E-mail: embryossa@gmail.com

Поступила в редакцию 05.08.2011 г.

**РЕФЕРАТ** Применение клеточных технологий позволило добиться существенного прогресса в лечении дефектов сетчатой оболочки глаза. Уже разработаны протоколы, позволяющие обеспечить нейрональную дифференцировку клеток, трансплантированных в сетчатку. Однако вопросы функционального замещения утраченных нейронов сетчатки трансплантированными клетками остаются открытыми. Для доказательства возможности трансдифференцировки трансплантированных EGFP<sup>+</sup>-клеток стромы костного мозга (ММСК) и нейрональных стволовых/прогениторных клеток (НСПК) мышей с последующей их функциональной интеграцией применен метод органотипического культивирования, позволяющий детально охарактеризовать поведение клеток после трансплантации. Методами атомно-силовой микроскопии показано достоверное отличие ( $p < 0.01$ ) в толщине отростков, формируемых глиальными и эндотелиальными компонентами сетчатки, и отростков нейронов и трансплантированных ММСК, а также формирование синаптических расширений диаметром до  $2.5 \pm 0.06$  мкм введенными ММСК на 4-е сутки после трансплантации.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** стволовые клетки, трансплантация *in vitro*, органотипические культуры сетчатки, пластичность стволовых клеток, репарация сетчатки.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ММСК – клетки стромы костного мозга; НСПК – нейрональные стволовые/прогениторные клетки; EGFP – улучшенный зеленый флуоресцентный белок.

## ВВЕДЕНИЕ

Изменения в сетчатой оболочке глаза, вызванные разнообразными внешними повреждающими факторами, часто ведут к частичной или полной потере зрения. Для эффективного лечения при патологических состояниях сетчатки необходимо понимать процессы, вовлеченные в их возникновение и развитие, а также процессы, приводящие к репарации таких состояний. В настоящее время с целью предотвращения развития необратимых нейродегенеративных процессов в сетчатке глаза разрабатываются методы трансплантации клеток с широким дифференцировочным потенциалом – стволовых/прогениторных элементов нервной ткани (НСПК) или клеток стромы костного мозга (ММСК). Считается, что после введения в организм реципиента эти клетки не только активно мигрируют к месту повреждения и замещают своими дифференцированными потомками утраченные элементы ткани, но и секретируют целый спектр трофических и регуляторных факторов, поддерживающих функциональность поврежденной

ткани и активирующих ее собственные системы репарации [1].

К сожалению, накопленный к настоящему времени теоретический и практический материал в области биологии стволовых клеток не позволяет достоверно прогнозировать эффективность терапии при помощи клеточной трансплантации. Мы все еще далеки от полного понимания тех механизмов, которые запускают восстановление ткани реципиента при введении клеток, и в настоящее время не представляется возможным этот процесс контролировать. В связи с этим целесообразно создание адекватных модельных систем, максимально приближенных к условиям *in vivo*, которые позволят не только с легкостью детектировать процессы клеточной миграции, дифференцировки и гибели клеток на любых сроках после трансплантации, но и вносить коррективы в поведение трансплантируемых клеток. Одной из таких моделей является органотипическая эксплантационная культура сетчатки глаза крысы. При данном типе культивирования удастся получить образцы,

длительное время сохраняющие исходную цитоархитектонику и клеточный состав *in vitro* [2].

Наиболее удачной экспериментальной моделью повреждения сетчатки глаза представляется индуцированное лазером локальное повреждение эксплантата сетчатки в системе *in vitro*. Такой подход позволяет наносить строго дозированные повреждения, т.е. получать воспроизводимые результаты во всей серии экспериментов. Ввиду возможности независимого контроля различных параметров лазерного излучения его применение в экспериментальных работах по моделированию повреждения нейрональных сетей представляется чрезвычайно перспективным и удобным.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

#### Получение культур сетчатки

Для получения эксплантационной культуры сетчатки глаза использовали 4-дневных самцов крыс Wistar. Вскрытие глазного яблока проводилось по модифицированному протоколу [3]. После выделения сетчатку помещали на поверхность чашки Петри диаметром 35 мм таким образом, чтобы слой фоторецепторов находился сверху.

Культивирование проводили в стандартных условиях (+37 °С, 5% CO<sub>2</sub>, 98% влажности) в течение 30 дней в среде DMEM/F12 (НПП «ПанЭко», C420/C600), содержащей глутамин («Sigma», G-8540) и инсулин-трансферрин-селенит в разведении 1 : 50 (НПП «ПанЭко», Ф-065), с добавлением сыворотки FCS™ 5% («HyClone», SH30109.03), основного фактора роста фибробластов (10 нг/мл, «Sigma», F0291) и эпидермального фактора роста (10 нг/мл, «Sigma», E9644), гепарина, гентамицина в концентрации 5 мкл/мл («Sigma», G1264), добавки N2 в разведении 1 : 100 («Gibco», 17502-048) и B27 в разведении 1 : 50 («Gibco», 17504044).

#### Повреждение эксплантата

В качестве повреждающего фактора использовали инфракрасный лазер (1480 нм) Zilos-tk™ («Hamilton Thorne») миллисекундного диапазона мощностью 300 мВ, нагревающий поверхность в области фокуса до 150 °С. Для повреждения выбирали квадрат со стороной 100 мкм средней зоны разрастания края эксплантата. Сетчатку повреждали 15 импульсами лазера длительностью 1000–3000 мс на 14-е сутки культивирования эксплантатов.

#### Трансплантация клеток

Для получения культуры ММСК использовали красный костный мозг EGFP+ мышей линии C57BL/6-Tg(АСТВ-EGFP)/Osб/J в возрасте 1 мес.

Непосредственно после умерщвления производили забор красного костного мозга из большеберцовых и бедренных костей животного по стандартному протоколу [4]. Строму костного мозга извлекали, промывая полость кости инсулиновым шприцем, заполненным средой DMEM с добавлением антибиотиков. Полученную суспензию центрифугировали в течение 7 мин при 1000 g, после чего супернатант сливали, осадок ресуспендировали и разводили средой для культивирования до плотности 1 × 10<sup>5</sup> клеток/мл. Первичную суспензионную культуру клеток стромы костного мозга помещали на чашки для культивирования диаметром 60 мм и через 1 сут пассировали в очень низкой плотности – 1–5 клеток в поле зрения при увеличении ×200 и культивировали до образования колоний.

Для получения культуры НСПК использовали материал субвентрикулярной зоны головного мозга 14-суточных эмбрионов мышей линии C57BL/6-Tg(АСТВ-EGFP)/Osб/J. После освобождения от мозговых оболочек головной мозг помещали в среду DMEM с антибиотиками, механически дезагрегировали с помощью пипетки до получения однородной суспензии клеток и центрифугировали в течение 5 мин при 1000 g. Супернатант сливали, осадок ресуспендировали в среде культивирования в концентрации 1 × 10<sup>6</sup>–2 × 10<sup>6</sup> клеток/см<sup>2</sup>. Клетки выращивали в культуре нейроэпителиального пласта.

Инъекцию клеток проводили стеклянным микрокапилляром на инвертированном микроскопе Nikon TE2000S, укомплектованном гидравлическими микроманипуляторами и инъекторами Narishige (ММО-202<sup>ND</sup>, IM-9B, IM-H1, Narishige HD-21), в зону разрастания клеток эксплантата в объеме культуральной среды 0.1 мкл на расстоянии 100, 1000 и 3000 мкм от зоны повреждения. Для оценки эффективности применимых в клинике протоколов трансплантации клеток в сетчатку глаза, имитирующих супрахориоидальную инъекцию, применяли метод нанесения суспензии трансплантируемых клеток на внешнюю (фоторецепторную) поверхность эксплантата при помощи микроинъектора в объеме среды не более 5 мкл.

#### Иммуногистохимический анализ

Иммуногистохимический анализ дифференцировки трансплантированных клеток проводили, выявляя маркеры нейрональной и глиальной дифференцировки: β-III-тубулин – с помощью антитела против изоформы βIII тубулина (anti-tubulin, beta III isoform antibody, «Chemicon», МАВ1637) и глиальный кислый фибриллярный белок – GFAP с помощью антитела против кислого фибриллярного глиального белка (anti-glia fibrillary acidic protein, «Sigma», G9269)

соответственно; оценивали также экспрессию маркера развивающихся нейритов GP-45 – с помощью антитела против регулируемого G-белком индуктора роста отростков нейритов 2 (G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2 antibody, «Abcam», ab110898) и маркера клеток эндотелия капилляров GSL-IB4 – изолектина *Griffonia simplicifolia* IB4 («Sigma», L1509).

### Получение изображений клеток

Прижизненные фотографии клеток получали с помощью инвертированного микроскопа Nikon TE2000S, флуоресцентные изображения – с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 25. Пространственную картину распределения трансплантированных клеток в эксплантате получали с использованием лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (микроскоп Axiovert 200LSM 510Meta «Carl Zeiss»).

### Статистический анализ

Анализ достоверности полученных результатов и статистическую обработку проводили при помощи программы STATISTICA 6.0. Наличие и достоверность различий между выборочными величинами независимых выборок оценивали при помощи непараметрического H-критерия Крускала–Уоллиса. Статистическую значимость отличий между группами инъекцированных клеток (ММСК, НСПК) определяли при помощи метода Стьюдента–Ньюмана–Келса (ANOVA).

### Атомно-силовая микроскопия (АСМ)

АСМ-изображения получены на атомно-силовом микроскопе Solver BIO Olympus (НТ-МДТ, Россия) с полем сканирования 100 x 100 x 7 мкм<sup>3</sup> и системой емкостных датчиков и кантилевера Veeco MSCT-AUNW («Veeco Instruments», США) жесткостью 0.01–0.03 Н/м. Для регистрации изгиба кантилевера использовали лазер с длиной волны 650 нм. С помощью совмещенного с прибором инвертированного оптического микроскопа осуществляли подвод кантилевера к образцу и устанавливали места сканирования. Изображения обрабатывали средствами программы Nova (НТ-МДТ, Россия).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первым этапом нашей работы было получение долгосрочно переживающих *in vitro* органотипических эксплантационных культур сетчатки глаза. На протяжении всего времени культивирования (до 30 сут) сохранялась цитоархитектоника ткани, в ее составе присутствовали основные типы клеток, характерные для интактной сетчатки *in vivo* [5] (рис. 1). Таким об-

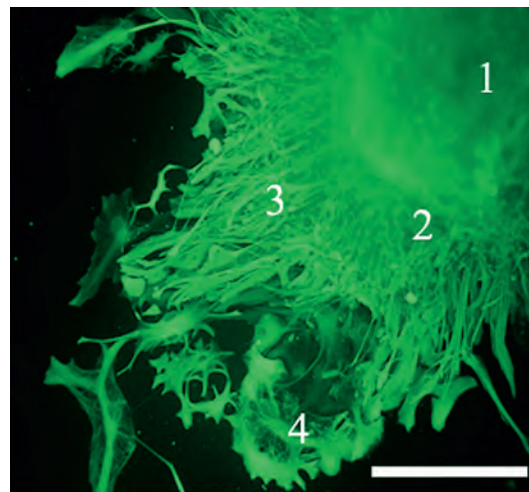
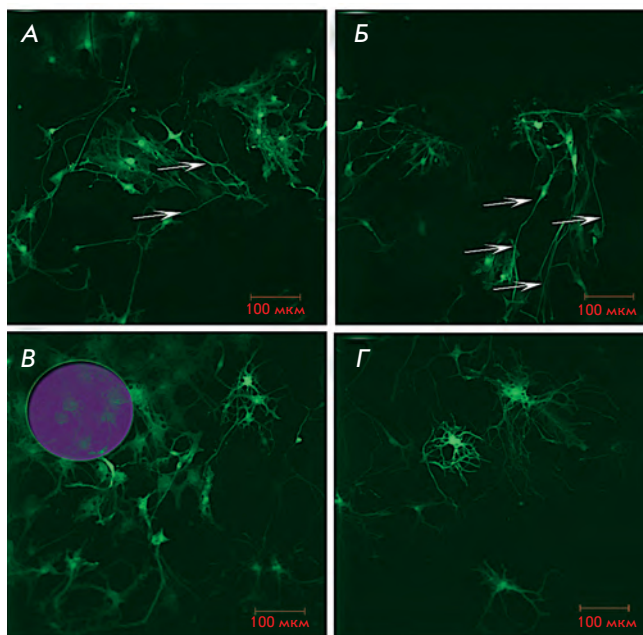


Рис. 1. Миграция клеток из эксплантата сетчатки (1) с образованием многоклеточной ближней (2), средней (3) и монослойной дальней (4) зоны разрастания края эксплантата. Масштабный отрезок 300 мкм.

разом, данная эксплантационная культура представляет собой адекватную модель развивающейся нейросетчатки, которая позволяет сохранить микроокружение входящих в ее состав нервных клеток.

При повреждении лазерным импульсом отчетливо изменялась макроструктура ткани в области фокуса луча, что сопровождалось потемнением цитоплазмы клеток, их интенсивной вакуоляризацией и коагуляцией межклеточного матрикса. Наблюдался отсроченный эффект лазерного облучения в виде массовой клеточной гибели в зоне повреждения эксплантата сетчатки на 2–3-и сутки после нанесения травмы. Вокруг непосредственной зоны воздействия лазера (100 x 100 мкм) формировалась зона массовой клеточной гибели радиусом до 500 мкм. Таким образом, лазерное повреждение было легко визуализируемым, проявлялось в существенной реорганизации межклеточного матрикса (коагуляции), приводило к утрате клеточных взаимосвязей и изменению морфологии клеток, завершалось их гибелью и носило необратимый характер.

Для моделирования процессов восстановления поврежденной области сетчатки после воздействия лазера в среднюю зону расселения клеток эксплантата инъекцировали НСПК и ММСК EGFP+ мышей. Оказавшись в новом микроокружении, трансплантированные клетки активно мигрировали и изменяли свою морфологию, выпуская длинные ветвящиеся отростки и приобретая фенотип, характерный для нейронов.



**Рис. 2.** Направленный таксис НСПК к зоне лазерного повреждения эксплантата сетчатки глаза. А, Б — Образование и распространение нейритов (указаны стрелкой), трансплантированными EGFP+ клетками по направлению вектора от места инъекции к области лазерного повреждения сетчатки. В, Г — Локализация трансплантированных НСПК в зоне лазерного повреждения сетчатки на 7 сутки после инъекции и образование ими густой сети нейритов на 14 сутки.

Было проанализировано распределение EGFP+ клеток относительно зоны поражения и зоны инъекции по вектору их миграции в течение первых 24 ч, а также на третьи и седьмые сутки после трансплантации. При сравнении распределения EGFP+ клеток было установлено, что наиболее активно клетки мигрируют от места трансплантации к области повреждения (рис. 2А,Б). Ежедневная регистрация миграции клеток методом конфокальной микроскопии показала, что наиболее активно она происходила в первые 24 ч и значительно снижалась по мере их морфологической дифференцировки на третьи сутки после инъекции. Первые клетки, пришедшие в зону воздействия лазера, детектировали спустя 1 ч после трансплантации при введении их на расстоянии 100 мкм, через 12 ч — при инъекции на удалении на 500 мкм и через 3–5 сут — при трансплантации более чем в 1000 мкм от места повреждения. Наиболее активное привлечение клеток в поврежденную область происходило на протяжении первых 3 сут после создания дефекта сетчатки и резко угасало в дальнейшем. Было показано, что в течение 3 сут после трансплан-

тации инъекцированные клетки активно мигрировали на расстояния, превышающие 1000 мкм от места введения, причем клетки перемещались в направлении области повреждения. Инъекцированные клетки распространялись в эксплантате вдоль вектора, направленного к области травмы, на расстояние 5 мм, а в противоположном направлении не более 1 мм (рис. 2В,Г). Статистическая обработка результатов подсчета EGFP+ НСПК в одном поле зрения в зоне повреждения и на таком же расстоянии по вектору, проходящему через место инъекции, показала значимо большее ( $p < 0.01$ ) количество трансплантированных клеток в области (рис. 3).

В контрольных эксплантатах, подвергнутых точечной трансплантации без лазерного повреждения, распространение инъекцированных клеток было однородным по всем направлениям с превалированием миграции от центра эксплантата по миграционным путям выселяющихся из него клеток. Таким образом, показана неоднородность распределения трансплантированных НСПК относительно места введения при нанесении повреждения лазером — наличие таксиса, направленного к зоне дефекта. Аналогичные результаты по изменению поведения инъекцированных клеток в нейрональном микроокружении получены при трансплантации НСПК *in vivo* [6].

При достижении зоны повреждения миграция клеток прекращалась, наблюдалось образование ими асинаптических дендритов, распространяющихся во всех плоскостях, и агрегация трансплантированных клеток друг с другом. Пришедшие в поврежденную область клетки оставались в ней на протяжении всего эксперимента (до 30 сут после трансплантации) и полностью утрачивали миграционную активность, образуя густую сеть нейритов.

Существенное влияние на поведение трансплантированных клеток оказывала их концентрация при трансплантации. Введение в эксплантат единичных клеток приводило к быстрой остановке их передвижения внутри сетчатки и сопровождалось слабой морфологической дифференцировкой. Единичные НСПК приобретали глиальный фенотип и обладали маркерами глиальной дифференцировки — GFAP, начиная с 5 суток после трансплантации. Единичные ММСК не сохранялись в эксплантате дольше суток. При трансплантации 50–100 клеток их миграционная активность была подавлена, они образовывали ассоциаты, их таксис был направлен друг к другу, и лишь единичные клетки мигрировали на значительные расстояния. Иная картина наблюдалась при трансплантации более 1000 клеток. В этом случае большинство клеток активно перемещалось к области повреждения, где они образовывали длинные нейриты, служащие для перемещения других клеток. Быстрее

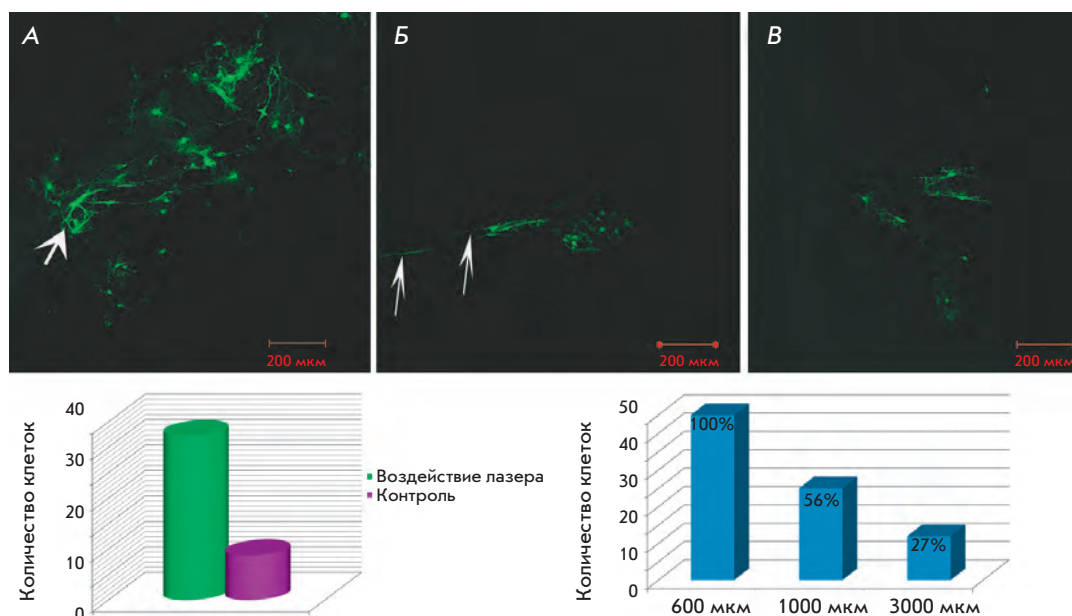


Рис. 3. Миграция трансплантированных НСПК в зоны повреждения, удаленные на 600 (А), 1000 (Б), 3000 мкм (В) от области инъекции. Диаграммы количественных отличий между миграцией клеток в поврежденном и intactном эксплантате и гистограмма процентного соотношения количества клеток в различно удаленных от места инъекции зонах повреждения.

(по сравнению с intactным эксплантатом) происходила и дифференцировка НСПК с преобладанием нейрональной составляющей и экспрессией трансплантированными клетками  $\beta$ -III-тубулина и GR-45. В составе эксплантата инъекционные клетки не только сохраняли жизнеспособность на протяжении более 2 мес, но и активно пролиферировали.

При исследовании распределения трансплантированных НСПК в эксплантате с несколькими последовательно расположенными зонами лазерного повреждения, находящимися на различном расстоянии от места инъекции (600, 1000 и 3000 мкм), было показано заселение трансплантированными клетками всех зон повреждения в течение 7 сут после инъекции (рис. 3). Однако было отмечено уменьшение количества клеток в зонах повреждения по мере их удаления от области введения. Так, в зоне повреждения, удаленной на 1000 мкм от места трансплантации, находилось 56% клеток, зарегистрированных в зоне, удаленной на 600 мкм, а в зоне, удаленной на 3000 мкм – всего 27%.

Для трансплантации ММСК и НСПК применили два метода введения: непосредственную инъекцию в глубь средней зоны края разрастания эксплантата и поверхностное нанесение клеток. В первом случае трансплантированные клетки непосредственно контактировали с нейрональной составляющей, во втором имитировалась супрахориоидальная инъекция *in vivo*. При нанесении НСПК на поверхность эксплантата сетчатки наблюдалось практически полное отсутствие их миграционной активности и процессов нейрональной дифференцировки (негативное окра-

шивание на  $\beta$ -III-тубулин). Это наблюдение позволяет объяснить незначительный терапевтический эффект трансплантированных НСПК в клинической практике при супрахориоидальной или ретробульбарной инъекции [7]. При инъекции НСПК в глубь слоев нейросетчатки трансплантированные клетки активно мигрировали и изменяли свою морфологию, выпускали длинные ветвящиеся отростки, приобретали фенотип, характерный для нейронов, положительно окрашивались на  $\beta$ -III-тубулин и GR-45.

При внесении ММСК обоими методами наблюдали быструю миграцию отдельных клеток небольшого диаметра (10–15 мкм), образование ими длинных нейритоподобных выростов и ламеллоподий. Таким образом, происходила морфологическая дифференцировка трансплантируемых клеток согласно их новому микроокружению, с приобретением ими фенотипа нейральных клеток (рис. 4). При трансплантации более 500 клеток наблюдалась сохранность ММСК в составе эксплантата в течение 30 сут. Трансплантированные ММСК приобретали два характерных фенотипа: нейрональный – с длинными тонкими ветвящимися отростками, имеющими ампулярные расширения, и оформленным компактным телом клетки, и глиальный – с ламеллоподиальными выростами цитоплазмы и крупным ядром с хорошо различимыми ядрышками. Нейритоподобные выросты ММСК проникали в глубь эксплантата сетчатки, образовывали анастомозы и контактировали с другими трансплантированными клетками и нейронами самого эксплантата, т.е. поведение трансплантированных в микроокружение нейросетчатки ММСК

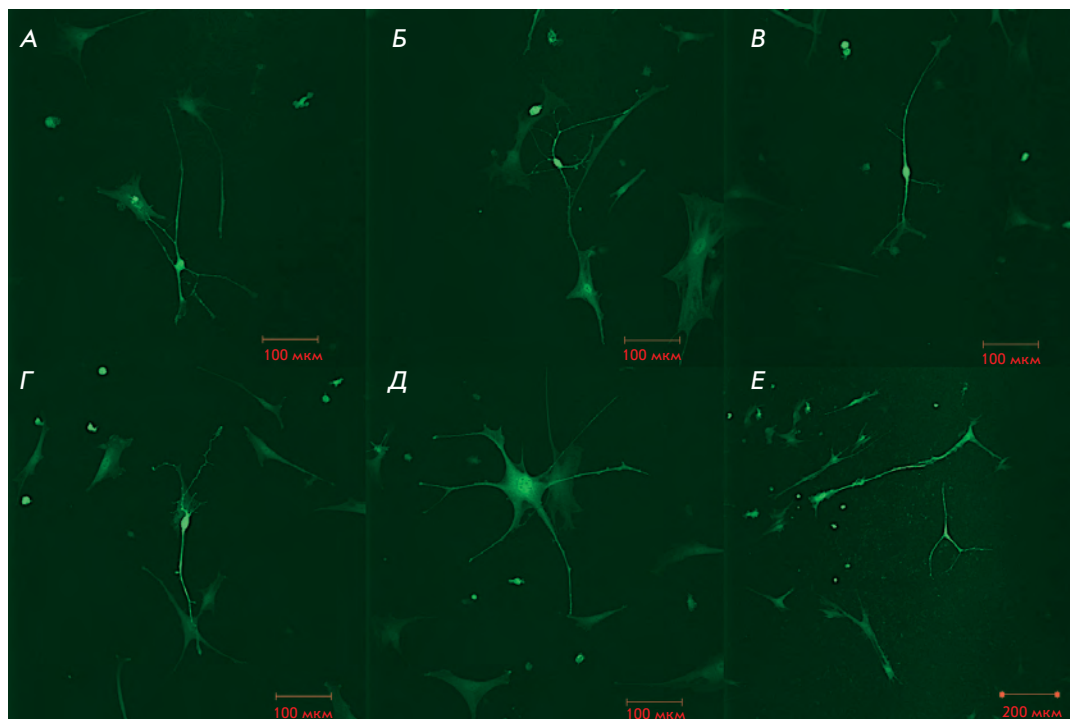


Рис. 4. Изменение морфологии трансплантированными ММСК в эксплантатах сетчатки, поврежденных лазерным излучением. А–Г – Приобретение нейрональной морфологии инъецированными ММСК. Д, Е – Дифференцировка инъецированных ММСК по глиальному фенотипу.

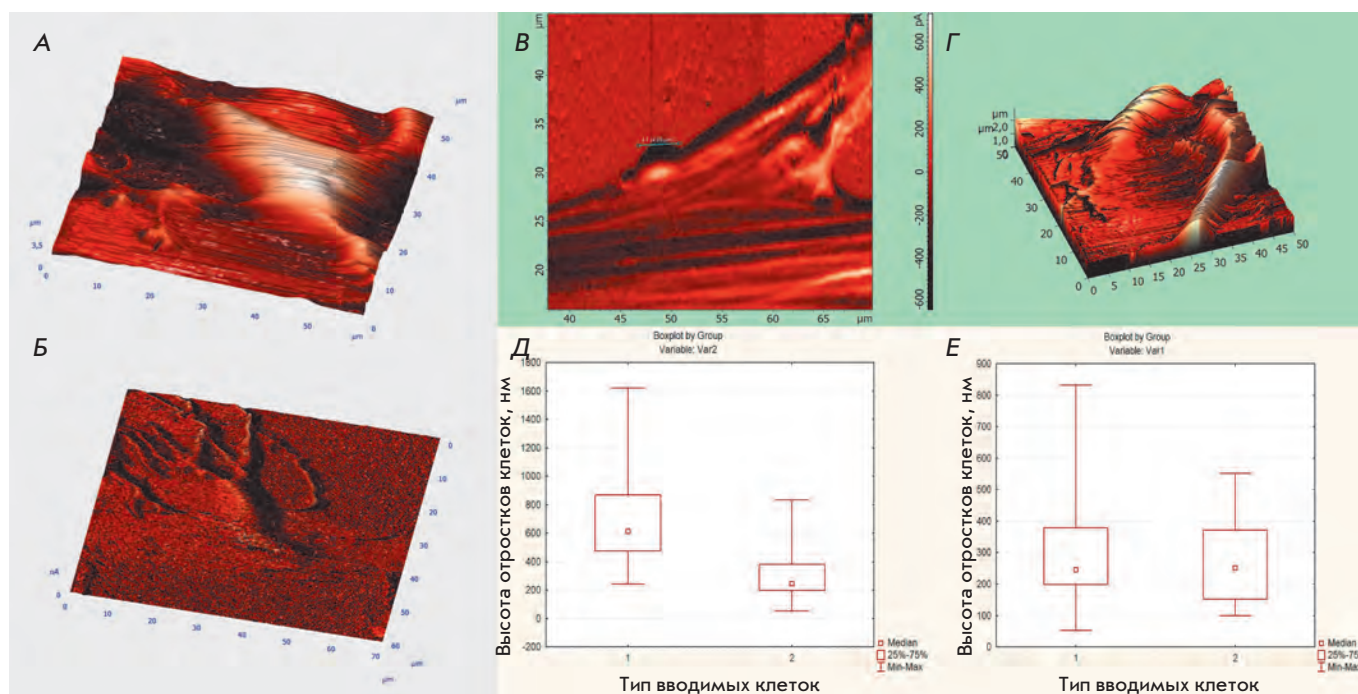
было сходным с поведением инъецированных НСПК. Однако, в отличие от НСПК, способ введения ММСК не влиял на активность миграции трансплантированных клеток. Как при нанесении на поверхность, так и при инъекции в глубь эксплантата ММСК мигрировали по всем направлениям от места введения в течение первых суток. С началом дифференцировки клеток их миграция останавливалась, что позволяет говорить о важности первых часов после трансплантации для миграции введенных клеток, занятии ими новых ниш, пролиферации и дифференцировки с последующей возможностью репарации дефектов [8].

При повреждении эксплантата морфология ММСК изменялась быстрее по сравнению с клетками, введенными в контрольные образцы, не подвергнутые воздействию лазера. В данной серии экспериментов морфологические изменения ММСК появлялись спустя 24 ч после инъекции, в то время как в контроле – лишь через 3 сут. Эти данные позволяют предположить, что для морфологической дифференцировки трансплантированных клеток, отвечающей условиям их нового микроокружения, чрезвычайно важны регуляторные факторы, высвобождающиеся при гибели клеток в районе нанесения повреждения.

При помощи атомно-силовой микроскопии показано морфологическое преобразование трансплантированных ММСК в клетки с нейрональным фенотипом, их активная миграция до 3 сут после инъекции

и образование биполярных и мультиполярных нейритоподобных отростков. Выселению клеток из эксплантата сетчатки предшествовало образование ламеллоподиальных выростов. При помощи АСМ удалось измерить высоты данных отростков и изучить их пространственное распределение, а также оценить шероховатость их поверхности. По данным АСМ, средняя длина первичных ламеллоподий мигрирующих клеток составила  $10.1 \pm 2.0$  мкм, а их средний диаметр –  $3.6 \pm 0.5$  мкм. К 7 сут культивирования наблюдалось увеличение протяженности асинаптических дендритов, выпускаемых расселяющимися клетками эксплантата сетчатки. По данным АСМ, их средняя длина составила  $21.7 \pm 5.0$  мкм, средний диаметр –  $0.8 \pm 0.23$  мкм. По поверхности глиальных (GFAP-иммунопозитивных) и эндотелиальных (GSL-IB4-иммунопозитивных, GFAP-иммунонегативных) клеток происходило распространение нейритоподобных отростков ММСК, которые достигали нескольких мм в длину и до 0.47 мкм в диаметре (рис. 5А,Б).

Количественный анализ распределения высот отростков между группами глиеподобных клеток и нейритоподобных ММСК выявил значимое отличие ( $p < 0.01$ ) в высоте отростков, формируемых глиальными и эндотелиальными компонентами сетчатки, и отростков нейронов и трансплантированных ММСК (рис. 5Д). Показано отсутствие статистически значимых отличий ( $p = 0.52$ ) в средней квадратичной



**Рис. 5.** АСМ-анализ поверхности инъекцированных ММСК, проводимый в контактном и полуконтактном режимах. А – Реконструкция поверхности ММСК, изменившей свою морфологию. Б – Начало выселения клеток из эксплантата, образование ламеллоподий. В, Г – Образование синаптических контактов между трансплантированными ММСК и клетками сетчатки. Д – Количественный анализ распределения высот отростков – 1 группа – глиальные клетки эксплантата сетчатки, 2 группа – отростки трансплантированных ММСК ( $p < 0.01$ ). Е – Количественный анализ распределения высот отростков – 1 группа – нейрональные клетки эксплантата сетчатки, 2 группа – отростки трансплантированных ММСК ( $p > 0.01$ ).

шероховатости поверхности трансплантированных ММСК, морфология которых изменилась на нейроноподобную, и нейронов сетчатки, а также отсутствие статистически значимых отличий ( $p = 0.26$ ) при сравнении асимметрии распределения отростков трансплантированных клеток и нейронов эксплантата сетчатки (рис. 5Е). При исследовании изображений поверхности клеток не удалось выявить статистически значимых различий в размахе высот отростков между ММСК и нейронами сетчатки, при наличии статистически значимых различий ( $p < 0.01$ ) высот отростков ММСК с высотами отростков глиальных и эндотелиальных клеток сетчатки. Получены АСМ-изображения синаптических расширений, формируемых трансплантированными ММСК, на концах нейритоподобных выростов (рис. 5В). Также изучено взаимодействие между такими синапсами и клетками эксплантата. Морфометрические параметры синапсов между трансплантированными ММСК и нейронами сетчатки не отличались от параметров между трансплантированными НСПК и клетками реципиента.

С применением красителя Di-I, которым окрашивали клетки эксплантата сетчатки, показано, что слияние трансплантированных EGFP+ ММСК и клеток сетчатки не происходило, так как отсутствовали клетки, несущие обе метки.

В результате полученных данных можно предположить, что для наиболее эффективного восстановления повреждения сетчатой оболочки глаза при помощи клеточной трансплантации оптимально использовать НСПК, вводимые непосредственно в состав нейросетчатки. Их приближенной и доступной альтернативой можно считать ММСК, способные запускать и поддерживать репарационные процессы в ткани реципиента, а также вставать на путь нейрональной дифференцировки [9]. Однако вопрос о функциональном замещении утраченных нервных клеток трансплантированными ММСК и их потомками все еще остается открытым.

### ВЫВОДЫ

Полученные эксплантационные культуры сетчатки эквивалентны нейросетчатке *in vivo*.

При инъекции ММСК и НСПК наблюдается их активная миграция в первые часы после трансплантации, идущая с различной скоростью при их инъекции в глубь слоев нейросетчатки и при поверхностном нанесении на эксплантат.

Определяющим фактором для дифференцировки трансплантированных клеток является микроокружение, в которое попадают вносимые клетки, в некоторых случаях возможно приобретение нейронального фенотипа трансплантированными в нейросетчатку ММСК.

При помощи лазерной установки получена возможность контролировать нанесение повреждений сетчатки *in vitro*, которое стимулирует миграционную активность трансплантированных клеток в направлении области травмы и ускоряет их дифференцировку согласно занимаемой нише. ●

*Работа выполнена при реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (№ П113).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bull N.D., Martin K.R. // *Regenerative Medicine*. 2009. V. 4. № 6. P. 855–865.
2. Johansson K., Ehinger B. // *Vision Res*. 2005. V. 45. P. 3235–3243.
3. Kretz A., Hermening S.H., Isenmann S. // *J. Neurosci. Methods*. 2004. V. 136. P. 207–219.
4. Schrepfer S., Deuse T., Lange C., Katzenberg R., Reichen-spurner H., Robbins R.C., Pelletier M.P. // *Stem Cells Dev*. 2007. V. 1. P. 105–107.
5. Семенова М.Л., Сергеев С.А., Сабурина И.Н., Кошелева Н.В. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2010. № 2. С. 55–61.
6. Александрова М.А., Подгорный О.В., Марей М.В., Полтавцева Р.А., Цитрин Е.Б., Гуляев Д.В., Черкасова Л.В., Ревещин А.В., Корочкин Л.И., Сухих Г.Т. // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2005. № 1. С. 13–19.
7. Сергеев С.А., Павлова Г.В., Тахчиди Х.П., Гаврилова Н.А., Ревещин А.В., Сабурина И.Н., Ланевская Н.И., Иванова З.Г., Бастаков В.А., Комова О.Ю., и др. // *Офтальмохирургия*. 2010. № 3. С. 33–38.
8. Blong C.C., Jeon C.J., Yeo J.Y., Ye E.A., Oh J., Callahan J.M., Law W.D., Mallapragada S.K., Sakaguchi D.S. // *J. Neurosci. Res*. 2010. V. 88. P. 1445–1456.
9. Lei Z., Yongda L., Jun M., Yingyu S., Shaoju Z., Xinwen Z., Mingxue Z. // *Cell Biol. Internat*. 2007. V. 31. P. 916–923.