

Использование органотипической культуры сетчатки как модели для исследования миграционной активности трансплантированных клеток

М.Л. Семенова¹, С.А. Сергеев¹, И.Н. Сабурина², Н.В. Кошелева^{1,2}

¹ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

² НИИ Общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва

Using organotypic cultures of the retina as a model for studying migratory activity of transplanted cells

M.L. Semenova¹, S.A. Sergeev¹, I.N. Saburina², N.V. Kosheleva^{1,2}

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow

² Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow

В последние годы накоплен значительный экспериментальный материал в области биологии стволовых клеток и выполнено большое количество клинических работ. Однако все еще остаются открытыми вопросы о взаимодействии трансплантированных клеток с новым микроокружением реципиента и их выживаемости. Нами в качестве модели влияния трофических факторов и трансплантированных клеток на сетчатку была выбрана органотипическая эксплантационная культура сетчатки новорожденной крысы. В первую очередь данный выбор объясняется сохранностью citoархитектоники сетчатой оболочки глаза и клеточных взаимосвязей при данном методе культивирования. Кроме того, применение органотипических культур существенно облегчает микрохирургические процедуры введения клеток, давая возможность строго контролировать число и место введения клеток, и визуализации их распространения и выживаемости в сетчатке, позволяет вести прижизненные микроскопические наблюдения с любым интервалом времени и четко контролировать условия выращивания клеток.

В данной работе были использованы прикрепленные культуры сетчатки новорожденных крыс Wistar, служившие моделью развивающейся нейросетчатки. Культивирование - экплантатов сетчатки проводили в стандартных условиях в модифицированной среде DMEM/F12 с добавлением ростовых факторов, 10% сыворотки и антибиотиков. На 10-е сут. в культуры сетчаток инъецировали ксеногенные клетки мышей линии C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)/Osb/J (мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК), нейральные стволовые/прогениторные клетки (НСПК) субвентрикулярной зоны, клетки пигментного эпителия (ПЭ) глаза). Производили прижизненные наблюдения за выживаемостью инъецированных клеток, за их миграцией на различных сроках с последующим иммуногистохимическим окрашиванием на маркеры дифференцировки клеток в глиальном и нейрональном направлениях (GFAP и β -III-тубулин соответственно).

Были продемонстрированы достоверные отличия в выживаемости различных типов клеток в новом микроокружении, показана наибольшая миграционная активность ММСК и НСПК в первые часы после инъекции и проанализированы морфологические изменения введенных типов клеток.

Ключевые слова: органотипическая культура, экплантационная культура сетчатки, трансплантация стволовых клеток, клеточная миграция.

Эффективность клеточной и тканевой терапии уже сегодня открывает реальную перспективу широкого применения принципиально новых методов лечения болезней. Однако фундаментальные вопросы о взаимодействии введенных клеток с микроокружением

A lot of experimental data have been accumulated and numerous clinical trials have been conducted in the field of stem cell biology in recent years. But still there are many open questions about the survival of transplanted cells, interaction between transplanted cells and recipient microenvironment. That's why it is necessary to develop experimental models of damaged retina which allow studying the behavior of individual cells after transplantation. We used organotypic explantation culture of newborn rat neuroretina as a model to study influence of transplanted cells and trophic factors on neuroretina. The advantages of this model are: visualization of transplanted cells, simple analysis of their morphology, survival capacity in neuroretina, interactions with recipient tissue and migration ability.

We used newborn rat neuroretina explantation culture (DMEM/F12 with 20 ng/ml FGF and EGF, 7% FCS and antibiotics). After 10 days of cultivation retina pigment epithelium cells, MMSC and NSPC from the subventricular brain zone of C57BL/6-Tg(ACTB-EGFP)/Osb/J GFP+ mice were transplanted into the cultured neuroretinal explants. The immunohistochemical staining for β -III-tubulin and GFAP was carried out.

In our study significant difference in the survival capacity and migration ability of different cell types has been demonstrated, and morphological changes of transplanted cells were have been analyzed.

Key words: organotypic culture, explantation neuroretina culture, stem cell transplantation, cell migration.

реципиента все еще до конца не понятны. Не ясно и то, что побуждает клетки избирательно мигрировать в области поражения и восстанавливать ткани даже при системном введении в кровоток. И, наконец, остается непонятым, что происходит с клетками и их потомка-

e-mail: embryossa@gmail.com

ми в тканях реципиента при трансплантации, с какими клетками они устанавливают взаимосвязи и как регулируется их поведение.

На все эти вопросы может помочь найти ответы метод органотипического культивирования. Моделирование в экспериментальных условиях трансплантации стволовых клеток в организм реципиента на примере инъекции этих же клеток в эксплантат *in vitro* позволит гораздо глубже понять клеточную иерархию в различных тканях и организацию их ниш. Накопление экспериментальных данных в этой области даст возможность значительно продвинуться в понимании функционирования организма на клеточном и субклеточном уровнях, а значит повысить практический выход из экспериментальных работ.

Начиная с 60-х гг. XX века, различные типы клеточных и тканевых культур сетчатки широко используются в нейроофтальмологии как экспериментальные модели развития и патологии сетчатки. В этих исследованиях значительное внимание уделяется органотипическим культурам, основным преимуществом которых является максимальная сохранность цитоархитектоники сетчатки [1]. Эксплантаты сетчатки обладают теми же биохимическими и физиологическими особенностями, что и сетчатка *in vivo* и могут поддерживаться в культуре очень долгое время — от нескольких дней, до месяцев [2] и интенсивно используются для исследования разнообразных клеточных ассоциаций.

Потеря зрения при дегенеративных заболеваниях сетчатки обычно связана с нарушением функции клеток пигментного эпителия сетчатки (ПЭ). Его клетки, содержащие пигмент, секретируют огромное количество ростовых и регуляторных паракринных факторов [3], принимающих активное участие в развитии нервных клеток сетчатки, ее глиальных компонентов и блокирующих прораствание сосудов в нейросетчатку [4].

Нарушения слоя ПЭ приводит к необратимым изменениям в сетчатой оболочке и, следовательно, к частичной, либо полной потере зрения. Клиническими исследованиями доказана возможность трансплантации клеток ПЭ для восстановления зрения [5]. Трансплантация суспензии клеток ПЭ под сетчатку помогает предотвратить разрушение фоторецепторных клеток, гиперваскуляризацию сетчатой оболочки и нормализовать трофику клеток сетчатки.

Кроме того, предотвратить потерю зрения помимо введения клеток ПЭ, позволяет использование стволовых клеток. Подходы, связанные с ауто трансплантацией гемопоэтических или мезенхимных стволовых клеток, уже начинают успешно использоваться в клинических испытаниях для лечения многих заболеваний, в том числе и в офтальмологии. Трансплантация мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) в зоны повреждения различного генеза приводит к значительным улучшениям и ускорению в них процессов репарации и стимуляции трофики ткани. Считается, что при трансплантации в организм реципиента, ММСК заполняют новые ниши и дифференцируются согласно их микроокружению. Это способствует длительному терапевтическому воздействию ММСК на ткань и дает возможность их широкого клинического применения.

Независимо от того, какая была произведена трансплантация (аллогенная или ксеногенная), судьба введенных стволовых клеток зависит от условий их культивирования, возраста реципиента и локальных свойств ткани, в которые были трансплантированы клетки, то есть зависит от их микроокружения. Поэтому в нашей

работе, кроме ММСК, попадающих при трансплантации в сетчатку в новое микроокружение, использовались нейральные стволовые/прогениторные клетки (НСПК). Показано встраивание меченых НСПК во все слои сетчатки и их дифференцировка в астроцитоподобные клетки, нейроны и олигодендроциты [6]. При введении НСПК супраретинально существенно улучшаются показатели ретинограммы, что свидетельствует о положительном терапевтическом воздействии трансплантированных в сетчатку клеток.

Использование неонатального реципиентного материала позволяет проследить встраивание трансплантированных клеток в уже сформировавшиеся ниши реципиентной ткани, и одновременно произвести анализ их влияния на механизмы поддержания развивающейся сетчатки.

В связи с вышеизложенным, целью нашей работы было следующее: на модели органотипической эксплантационной культуры сетчатки исследовать дифференцировку трансплантированных клеток в нейральном направлении, а также динамику их миграционной активности при инъекции в эксплантат различных типов клеток (ММСК, НСПК и клеток ПЭ).

Материал и методы

Культуры сетчатки

Источником получения эксплантатов сетчатки являлись новорожденные самцы крыс *Wistar*. В опыте использовали неонатальных (2-дневных) крыс. Для устранения влияния временного интервала после умерщвления животного, сетчатку выделяли из энуклеированных глаз непосредственно после декапитации при помощи микроинструментов, обработанных 70% этанолом для дезинфекции по протоколу А. Kretz (2007). Эксплантаты промывали раствором антибиотиков и помещали в культуральную чашку с полной питательной средой DMEM/F12 (ПанЭко, С420, С600) и добавлением цитокинов, антибиотиков и 5% эмбриональной телячьей сыворотки.

Культуры клеток для трансплантации

Донорами клеток являлись мыши линии С57BL/6-Tg(АCTВ-EGFP)/Osb/J, экспрессирующие маркер EGFP.

Для получения ММСК использовали красный костный мозг EGFP⁺ мышей месячного возраста. Непосредственно после умерщвления животного производился забор красного костного мозга из большеберцовых и бедренных костей по стандартному протоколу [7].

Культивирование ММСК проводили в среде DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, SH30109.03), L-глутамин (Sigma, G-8540), гепарина, фактора роста фибробластов, инсулин-трансферрин-селенита и антибиотика (гентамицин).

Для трансплантации стволовых клеток с потенциальными дифференцировками в нейрональные и глиальные элементы использовали культуру НСПК EGFP⁺ мышей. Для перевода в культуру и наращивания НСПК использовали область субвентрикулярной зоны головного мозга новорожденных мышей, которую отделяли от соединительной ткани и других отделов мозга микрохирургическими методами после вскрытия черепной коробки в стерильных условиях. Выделенная область содержит большое количество стволовых и прогениторных элементов, для выделения которых ее переводили в дезагрегированную культуру посредством механической и ферментативной обработки (трипсин + р-р Версена 10 мин. при +37°).

После получения первичной культуры суспензию НСПК помещали в термостат в культуральной среде DMEM/F12 с добавлением 2% эмбриональной сыворотки коров, L-глутамина, гепарина, фактора роста фибробластов, фактора роста эндотелия, инсулин-трансферрин-селенита, N2-добавки и антибиотика (гентамицин).

Помимо стволовых клеток, в работе были использованы высокодифференцированные клетки ПЭ глаз EGFP⁺ взрослых мышей. После ферментативной обработки трипсином с последующим центрифугированием отделяли клетки ПЭ от остальных типов клеток оболочек глаза. Для обогащения культуры клетками ПЭ перед трансплантацией в эксплантационных культурах сетчатки использовали среду DMEM/F12 с добавлением 5% эмбриональной сыворотки коров, L-глутамина, гепарина, фактора роста фибробластов, N2-добавки и антибиотиков (гентамицин).

Через каждые трое суток производили смену среды на свежеприготовленную, при необходимости пассировали клетки в смеси растворов трипсина и версена. Перед микроинъекцией клетки дорастивали до состояния монослоя. Инъекцию клеток проводили на 3–4 пассажах.

Микроинъекция клеток

Микроинъекцию клеток проводили капилляром из пироксного стекла диаметром 30 мкм под бинокуляром Olympus CZX 20 с цифровой камерой DP50 при помощи микроинъекционной приставки в зону разрастания клеток эксплантата в количестве культуральной среды 0,1 мкл на 10-е сут. культивирования эксплантатов сетчатки.

Иммуногистохимия

Для иммуногистохимического анализа использовали anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP) (Sigma, G9269) и mouse anti-tubulin, beta III isoform monoclonal antibody (Chemicon, MAB1637). Предварительно образцы отмывали PBS. Общее время инкубации в растворе первичных антител составило 12 ч. На следующий день проводилась окраска вторичными антителами Texas red, Cy2.

Анализ на жизнеспособность

Эксплантаты окрашивали йодидом пропидия (PI) для выявления погибших клеток (они имели красную окраску, обусловленную проникновением PI в ядра), ядра докрашивали Hoechst 33342, а цитоплазму контрастировали неконъюгированным Fluorescein isothiocyanate (FITC). Живые клетки окрашивались исключительно FITC и Hoechst 33342.

Анализ полученных результатов

Получение прижизненных фотографий клеток и флуоресцентных изображений проводили под инвертированным микроскопом Axiovert 25 с приставкой mbq 52 ac и цветной камерой DP 500. Анализ фотографий проводился с помощью пакета программ AxioVision 3.1. Также применяли метод конфокальной микроскопии на микроскопе Leica TCS SPE с программным обеспечением Leica application suite advanced fluorescence (LAS AF) и объективом 40X и микроскопе Carl Zeiss Axiovert 200LSM 510Meta для прижизненного наблюдения за миграцией клеток, инъекцированных в эксплантат сетчатки.

Анализ значимости полученных результатов и статистическая обработка проводились при помощи программы STATISTICA 6.0. Наличие и значимость разли-

чий между выборочными величинами независимых выборок оценивали при помощи непараметрического критерия Kruskal-Wallis. Статистическую значимость отличий между группами инъекцированных клеток (ММСК, НСПК, ПЭ) определяли при помощи теста Newman-Keuls (ANOVA).

Результаты и обсуждение

Была произведена трансплантация в эксплантаты нейросетчатки новорожденной крысы ксеногенных клеток. Причем в случае НСПК и ПЭ трансплантированные клетки попадали в свойственное им микроокружение, в то время как ММСК оказывались в совершенно новых для них условиях.

Для предотвращения искажения результатов по изменению морфологии отростков введенных клеток, их миграционной способности и пролиферативной активности были предприняты опыты по культивированию клеток ПЭ, ММСК и НСПК на среде для культивирования сетчатки (контроль) и на среде, кондиционированной эксплантатами. Значительных различий в двух группах экспериментов обнаружено не было, что позволяет говорить о непосредственном влиянии клеточного микроокружения на введенные в эксплантат клетки. Однако опыты по трансплантации клеток в эксплантаты сетчатки показали резкое снижение миграционной способности предифференцированных на кондиционированной сетчатке среде клеток, что позволяет сделать предположение о необходимости низкодифференцированного фенотипа клеток для достижения наибольшей миграционной способности. Отмечено резкое снижение подвижности клеток при дифференцировке, обусловленное в первую очередь сильным изменением морфологии клеток (образование отростков). Долгосрочные наблюдения в течение 2 мес. за трансплантированными клетками проводили с целью выявить динамику изменения их численности во времени. Анализ на жизнеспособность показал хорошую переживаемость клеток ПЭ и НСПК в течение 2 мес. как при введении в небольших (до 50 клеток) количествах, так и при значительном числе (500 и более) трансплантированных клеток. В то же время, для инъекцированных ММСК, попадающих в новое микроокружение, была продемонстрирована значительная клеточная гибель уже на 3–5 сут. кокультивирования с сетчаткой при введении малого (около 50) количества клеток и их сохранность при инъекции большого (> 200) количества клеток. Однако единичные клетки переживали в культуре достаточно длительный период времени и сохранялись на протяжении всего времени наблюдения за образцом (до 2 мес.) (табл.).

Процентная динамика численности трансплантированных клеток

Сутки с момента инъекции	% сохранности ММСК	% сохранности НСПК	% сохранности клеток ПЭ
1	100	100	100
2	81	90	88
3	67	110	80
4	59	103	80
5	40	106	80
6	37	106	79

С использованием критерия Kruskal-Wallis было показано достоверное отличие выживаемости ММСК, НСПК и клеток ПЭ на 1-е сут. ($N=7,581796$, $p=0,0226$), на 2-е сут. ($N=6,905353$, $p=0,0317$), на 5-е сут. ($N=6,320694$, $p=0,0424$) и на 6-е сут. культивирования после трансплантации ($N=6,61053$, $p=0,0367$). Попадая в свойственное им микроокружение, клетки ПЭ выживали достоверно лучше трансплантированных ММСК и НСПК.

При помощи теста Newman-Keuls было подтверждено статистически значимое ($p < 0,05$) отличие более высокой выживаемости клеток ПЭ от выживаемости ММСК и НСПК, начиная с первого дня культивирования, и отсутствие статистически значимого ($p > 0,05$) отличия в выживаемости ММСК и НСПК. Данная тенденция появления различий в более высокой выживаемости клеток ПЭ и стволовых клеток имела место на протяжении всего времени эксперимента (в течение 6 сут. после трансплантации).

После выселения за пределы эксплантата сетчатки миграционная способность ММСК резко падала, начиная с 3-го дня культивирования, но клетки не экспресировали дифференцировочные маркеры нейронов. В эксплантате сетчатки часть трансплантированных ММСК меняла морфологию, образуя длинные разветвленные тонкие отростки. В контрольных образцах клеток ММСК, которые культивировали в монослое на кондиционированной сетчатке среде, подобных изменений морфологии не наблюдалось. Наиболее интенсивно шло образование разветвленных отростков вне зоны эксплантата у клеток, выселившихся из него (рис. 1).

В опытах по долгосрочному культивированию НСПК происходила интенсивная дифференцировка введенных клеток в нейроноподобные клетки. Образовывались длинные сильноветвящиеся тонкие отростки, соединяющие различные группы трансплантированных клеток, наблюдалось формирование обширных сетей отростков нейроноподобных клеток, в т. ч. и с клетками сетчатки (рис. 2).

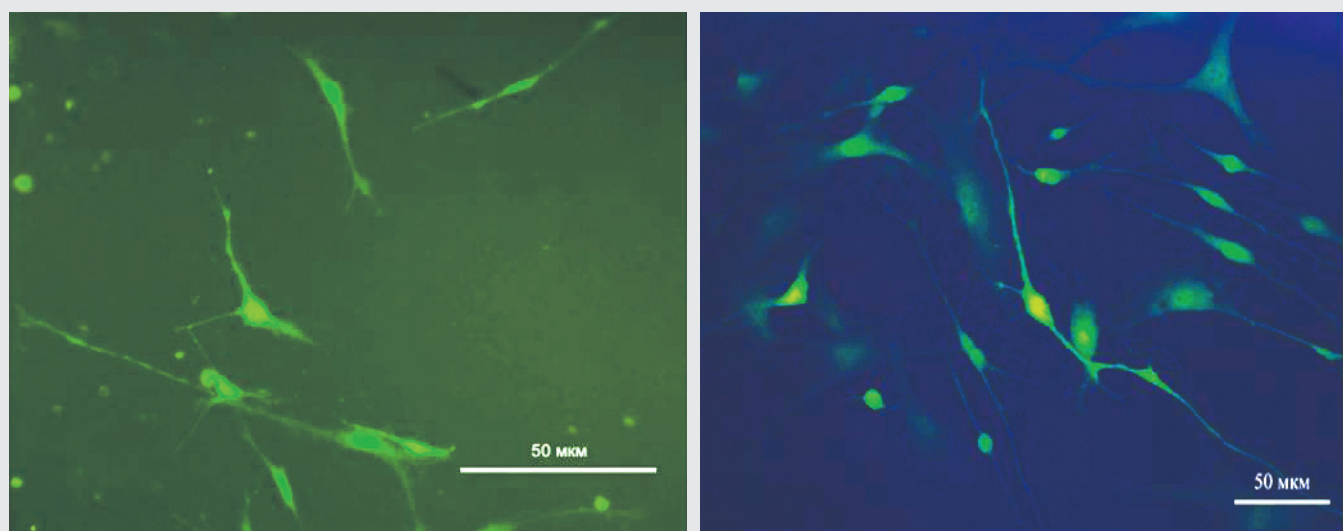


Рис. 1. Инъекцированные ММСК в эксплантате сетчатки (GFP^+ клетки флуоресцируют в зеленой области спектра). Окраска FITC (Fluorescein isothiocyanate) и Hoechst 33342. Сильное изменение исходной морфологии клеток в процессе культивирования в составе эксплантата по окончании их интенсивной миграции на 2-е сут. после трансплантации – образование длинных нейрито-подобных выростов клетками при отсутствии экспрессии GFAP и β -III-тубулина

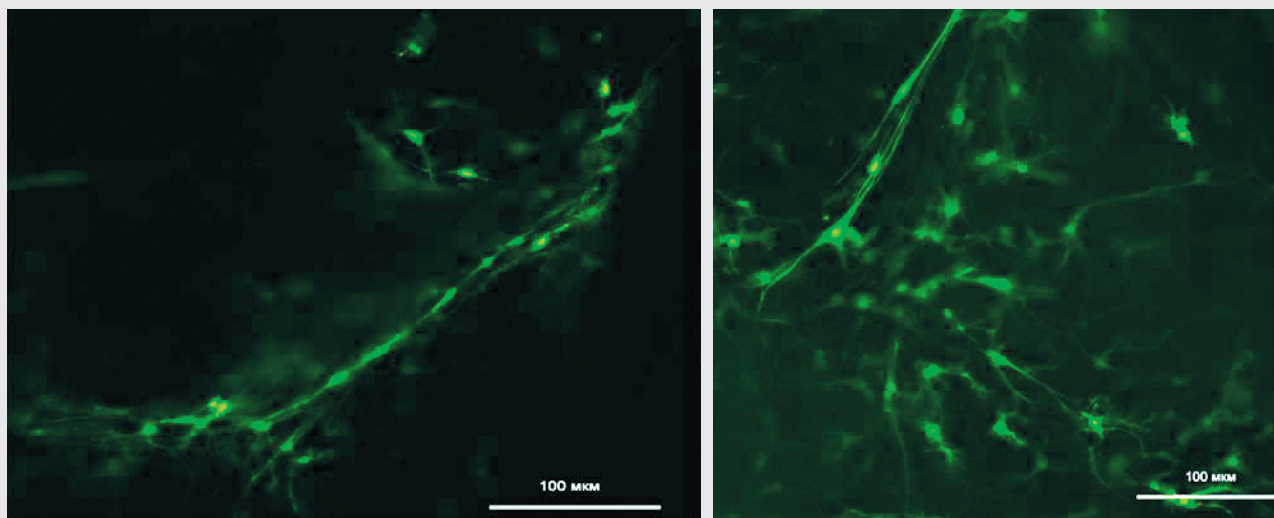


Рис. 2. НСПК в эксплантатах сетчатки. Окраска FITC и Hoechst 33342. Изменение морфологии инъекцированных НСПК, образование длинных ветвящихся нейритов и путей миграции в эксплантате сетчатки на 2-е сут. культивирования в составе эксплантата

Прижизненные наблюдения за распространением трансплантированных в сетчатку клеток позволили визуализировать пути миграции различных типов клеток и проследить динамику миграционных изменений инъецированных клеток.

Клетки пигментного эпителия практически не мигрировали из зоны введения, их распространение внутри эксплантата сетчатки, по-видимому, было обусловлено пассивным разнесением выселяющимися клетками самого эксплантата, так как происходило сравнительно медленно (несколько суток) и совпадало с основными путями движения расползающихся клеток кусочка сетчатки.

В противоположность клеткам ПЭ, низкодифференцированные ММСК и НСПК мигрировали активно и на большие расстояния. Распространение НСПК и ММСК от зоны введения за короткий промежуток времени (от нескольких часов до 6 сут.) и за пределы зоны миграции элементов самого эксплантата в случае ММСК позволяет говорить о самостоятельной подвижности этих клеток. Причем популяция введенных ММСК представлялась гетерогенной по миграционной способности ее клеток. Наибольшей подвижностью обладали клетки небольших размеров (около 10–15 мкм), выселяющиеся из зоны инъекции на значительное расстояние уже через час после трансплантации. Предположительно именно эти клетки и составляли пул истинных стволовых клеток костного мозга, что согласуется с классическими представлениями о стволовых клетках [8]. Кроме того, полностью избавиться от ге-

терогенности выращиваемых *in vitro* ММСК невозможно. Инъецированные ММСК образовывали агрегаты из клеток различного диаметра, к которым наблюдалась интенсивная миграция мелких клеток, проходящих для этого значительные расстояния (до 500 мкм) (рис. 3).

При проведении непрерывных наблюдений за трансплантированными ММСК и НСПК в течение первых 4 ч после инъекции происходила их массовая миграция из зоны введения, начинающаяся уже через 10 мин после трансплантации и продолжающаяся в течение всего эксперимента. В некоторых случаях наблюдалось сильное вытягивание инъецированных НСПК и образование ими отростков в течение первого часа эксперимента. Также наблюдалась миграционная подвижность ядродержащей части клетки вдоль образованных отростков. Кроме того, происходило перемещение НСПК и в вертикальном, и в латеральном направлениях, в отличие от ММСК, мигрирующих преимущественно латерально.

Распространение трансплантированных НСПК происходило исключительно по распластаным клеткам эксплантата и не наблюдалось на пластике чашки, что показывает необходимость клеточного окружения для изменения положения нейральных клеток. Распространение клеток шло с образованием коротких неветвящихся отростков, расположенных вблизи тела клетки и «ощупывающих» поверхности соседних клеток. Особенно много таких отростков образовывали наиболее активно мигрирующие клетки, проходящие значительные расстояния, среди клеток эксплантата сетчатки.

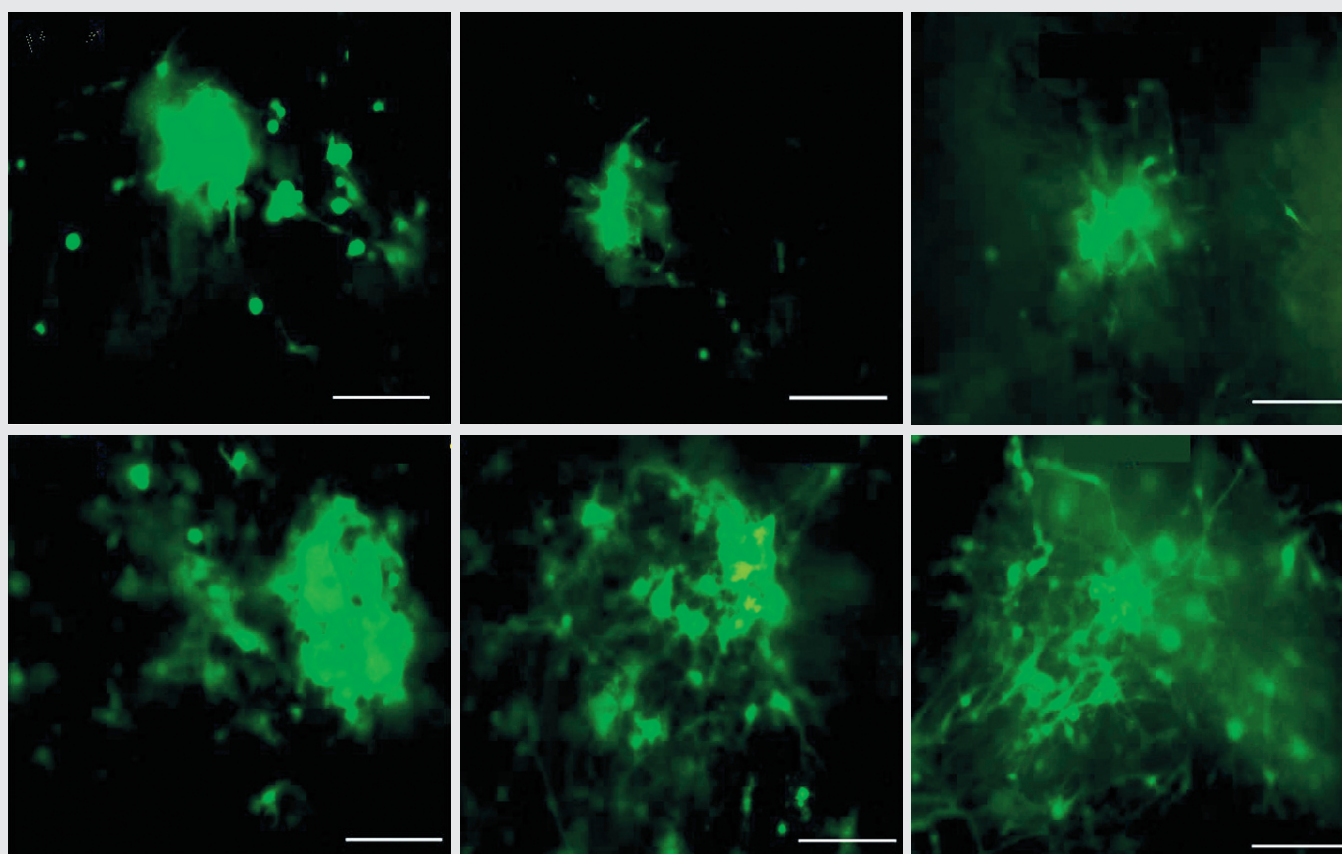


Рис. 3. Конфокальная микроскопия ММСК и НСПК в эксплантатах сетчатки. Миграция ММСК и НСПК в первые 3 сут. после инъекции. Прослеживается наиболее активная миграция НСПК до образования дифференцированных отростчатых клеток в первые двое суток после трансплантации. Распространение единичных НСПК сохранялась до 7-х сут. и происходило по отросткам дифференцированных клеток. Миграция ММСК останавливалась на 2-е сут. после трансплантации и завершалась образованием отростков инъецированными клетками

Прижизненные наблюдения за активно перемещающимися НСПК в течение 4 ч после инъекции показали, что при установлении достаточно большого числа контактов трансплантированной клетки с клетками эксплантата происходило резкое торможение миграционной активности трансплантированных клеток и начало их морфологических изменений, причем данные изменения в морфологии и подвижности клеток НСПК наблюдались уже на второй час после трансплантации. Наличие в эксплантате миграционных дорожек, то есть путей наибольшей и предпочтительной клеточной миграции, показывает неоднородность окружающих трансплантированные клетки тканевых структур. Данный факт позволяет сделать предположение о наличии специфических молекул адгезии, принимающих активное участие в миграции именно нейтральных клеток, и отсутствие таковых (VLA-4 и VLA-5) для стромальных ММСК [9].

Исследование образцов через двое суток на миграционную способность трансплантированных клеток активно мигрирующих ММСК и НСПК не выявило.

Распространяющиеся таким образом клетки, образывали отростки, связывающие их друг с другом. Непосредственное взаимодействие между клетками наблюдалось еще до стадии морфологической дифференцировки при продолжающихся процессах миграции, что может говорить в пользу предположения о необходимости установленных функциональных связей для нормальных процессов дифференцировки нервных клеток.

Отсутствие мигрирующих клеток уже на вторые сутки культивирования говорит о том, что расселение введенных клеток происходит в первые сутки или даже часы после трансплантации, что наблюдалось ранее в экспериментах нашей лаборатории [10]. Именно от условий непосредственно после инъекции будет зависеть скорость миграции вводимых клеток, их последующая локализация и способность к образованию отростков, а значит и терапевтический эффект, описываемый в клинике.

Наличие гетерогенности в миграционной способности в популяциях трансплантируемых клеток является

следствием неоднородности трансплантируемых *in vitro* клеток. Данная неоднородность проявлялась в том, что наибольшее количество мигрирующих клеток наблюдалось на второй час после трансплантации, потом происходила миграция отдельных клеток на небольшие расстояния, а через двое суток активное распространение инъекционных клеток практически прекращалось. Оставшиеся в области инъекции клетки не обладали подвижностью и оставались в месте инъекции, кроме того, такие клетки не проявляли потенции к дифференцировке.

Схожие данные были получены и при трансплантации клеток *in vivo* [11]. Наличие нескольких групп клеток с различной миграционной способностью показано для целого организма и продемонстрировано нами в условиях органотипической культуры, то есть *in vitro*.

Заключение

Таким образом, в нашей работе было показано, что при инъекции в эксплантат клеток с различными дифференцировочными способностями не происходят изменения морфологии и подвижности терминально дифференцированных клеток ПЭ, но имеет место сильное изменение морфологии ММСК и НСПК. Была показана значительная клеточная гибель ММСК при введении их в небольшом количестве (до 50) и их сохранность на протяжении 2 мес. при значительной концентрации клеток (более 200). Инъекционные ММСК изменяли свою морфологию, но не экспрессировали дифференцировочные маркеры нейронов (β -III-тубулин) и глии (GFAP). Миграция ММСК происходила в первые часы после инъекции. В отличие от них, инъекционные НСПК сохраняли миграционную активность в течение 24 ч после инъекции, дифференцировались с образованием нейроно- и глиеподобных клеток.

Нами было показано, что органотипическая культура сетчатки является адекватной моделью для исследования миграционной активности трансплантированных клеток и представляет удобный инструмент исследования поведения трансплантированных клеток в новое микроокружение реципиентной ткани.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Johansson K., Ehinger B. Structural changes in the developing retina maintained *in vitro*. *Vision Res.* 2005; 45(25-26): 3235–43.
2. Avwenagha O., Campbell G., Bird M.M. The outgrowth response of the axons of developing and regenerating rat retinal ganglion cells *in vitro* to neurotrophin treatment. *J. of Neurocytology* 2003; 32: 1055–75.
3. Malchiodi-Albedi F., Feher J., Caiazza S. et al. PEDF «Pigment epithelium-derived factor» promotes increase and maturation of pigment granules in pigment epithelial cells in neonatal albino rat retinal cultures. *Int. Dev. Neuroscience* 1998; 5(4): 312–21.
4. Yafai Y., Lange J., Wiedemann P. et al. Pigment epithelium-derived factor acts as an opponent of growth-stimulatory factors in retinal glial-endothelial cell interactions. *Glia* 2007; 55: 642–51.
5. Semkova I., Kreppel F., Welsandt G. et al. Autologous transplantation of genetically modified iris pigment epithelial cells: A promising concept for the treatment of age-related macular degeneration and other disorders of the eye. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99(22): 13090–5.
6. Wojciechowski A.B., Englund U., Lundberg C. et al. Long-term survival and glial differentiation of the brain-derived precursor cell line

RN33B after subretinal transplantation to adult normal rats. *Stem Cells* 2002; 20(2): 163–73.

7. Schrepfer S., Deuse T., Lange C. et al. Simplified protocol to isolate, purify, and culture expand mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2007; 1: 105–7.

8. Friedenstein A.J., Piatetzky-Shapiro II., Petrakova K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1966; 16(3): 381–90.

9. Coulombel L., Auffray I., Gaugler M.H. et al. Expression and function of integrins on hematopoietic progenitor cells. *Acta Haematol.* 1997; 97: 13–21.

10. Семенова М.Л., Зеленина И.А., Шафеи Р.А. и др. Наследственная мышечная дистрофия: биоинженерный подход к восстановлению мышечных волокон. *Онтогенез* 2005; 36(IV): 310–8.

11. Сабурина И.Н., Семенова М.Л., Гольдштейн Д.В. и др. Трансплантация эмбриональных миобластов и стромальных клеток костного мозга человека в скелетную мышцу мышей линии C57BL/10J/mdx. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2004; 137: 593–6.

12. Kretz A., Hermening S.H., Isenmann S. A novel primary culture technique for adult retina allows for evaluation of CNS axon regeneration in rodents. *J. Neuroscience Meth.* 2004; 136: 207–19.

Поступила 17.12.2009