

*На правах рукописи*

**СЕРГЕЕВ**

Сергей Александрович

**Органотипическая культура сетчатки глаза как модель для  
оценки эффективности трансплантации клеток**

03.03.05 – биология развития, эмбриология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

МОСКВА  
-2011-

Работа выполнена на кафедре эмбриологии Биологического факультета Московского Государственного Университета имени М.В.Ломоносова

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор

**Мария Львовна Семенова**

Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук,

заведующий Лабораторией проблем регенерации

**Элеонора Норайровна Григорян**

Институт Биологии Развития им. Н.К.Кольцова РАН, Москва

кандидат биологических наук, доцент

**Ксения Андреевна Рубина**

факультет Фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва

**Ведущая организация:**

Научно-исследовательский институт Морфологии человека РАМН, Москва

Защита диссертации состоится

**15 ноября 2011 года в 15 часов 30 минут**

на заседании диссертационного Совета Д.501.001.52

в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова

по адресу: 119899, Москва, МГУ, Биологический факультет, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ им М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан **15 октября 2011 года**

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук



Е.Н. Калистратова

## Общая характеристика работы

### Актуальность проблемы

Возможность направленной и контролируемой дифференцировки стволовых клеток является одной из наиболее актуальных задач современной биологии развития. Накопленные к настоящему времени данные по решающему значению микроокружения для дифференцировки трансплантированных стволовых клеток позволили существенно расширить возможности их терапевтического введения, а работы по трансдифференцировке одних клеточных типов в другие открывают широкие перспективы к репарации повреждений тканей с использованием клеточной терапии [Zwart *et al.*, 2008]. Но, несмотря на большое число примеров удачного использования трансплантированных клеток, все еще остаются нерешенными фундаментальные вопросы о взаимодействии введенных клеток с микроокружением реципиента. Так, например, почти не исследовано поведение инъецированных клеток при трансплантации в развивающиеся структуры, не закончившие свою дифференцировку. Продолжаются дискуссии о механизмах избирательной миграции трансплантата в области поражения и об эффективности восстановления ткани трансплантированными клетками. И, наконец, остается непонятным, что происходит с клетками и их потомками в ткани реципиента в первые часы после трансплантации, с какими структурами они устанавливают взаимосвязи и как регулируется их поведение.

В связи с этим необходимо 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 [Johansson *et al.*, 2000, Ghosh *et al.*, 2010]. Развитие сетчатки глаза не заканчивается в пренатальном периоде, а продолжается еще некоторое время после рождения. В течение этого периода онтогенеза происходит формирование четко организованной сложной пространственной структуры нейросетчатки, представляющей большой интерес для исследования поведения в ней трансплантированных клеток, изменения программы их дифференцировки в новом микроокружении и возможности их включения в образующиеся нейрональные сети сетчатки глаза.

Изменения в сетчатой оболочке глаза, вызванные разнообразными внешними повреждающими факторами, часто ведут к частичной или полной утрате зрения. Процесс репарация этих дефектов сходен с процессами нормального онтогенеза сетчатки. Для предотвращения развития необратимых нейродегенеративных процессов в сетчатке глаза предлагается применять трансплантацию клеток с

широкими потенциями к дифференцировке – стволовых/прогениторных элементов нервной ткани (НСПК) [Александрова и др., 2005, Blong et al., 2010] или клеток стромы костного мозга (ММСК) [Phinney et al., 2004]. При введении в организм реципиента, данные клетки активно мигрируют к месту повреждения, дифференцируются и замещают утраченные элементы дефектной ткани, а так же секретируют целый спектр трофических и регуляторных факторов, поддерживающих функциональность поврежденной ткани и активирующих ее собственные системы репарации [Blong et al., 2010]. Так же инъекции клеток пигментного эпителия (ПЭ) при различных повреждениях сетчатки приводят к значительному улучшению клинической картины и быстрой репарации повреждений сетчатой оболочки глаза [Semkova et al., 2002].

В ряде работ по трансплантации ММСК *in vivo* отмечается морфологическое и биохимическое преобразование этих клеток не только в нейроны [Sanchez-Ramos, 2002], но и в терминально дифференцированные фоторецепторные клетки [Tomita et al., 2006]. Костный мозг представляет собой сравнительно легкодоступный материал для выделения аллогенных мультипотентных клеток, использование которых позволяет избежать многих биомедицинских и этических проблем, ограничивающих применение НСПК [Kabos et al., 2002]. Однако вопрос о функциональном замещении нервных клеток трансдифференцированными ММСК и их потомками остается открытым.

### **Цель и задачи исследования**

**Целью** работы являлось создание модели нейросетчатки *in vitro* на базе органотипической эксплантационной культуры, пригодной для исследования распределения и дифференцировки различных типов клеток после их трансплантации и для оценки возможности функционального восстановления сетчатки при ее патологических изменениях.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Получить долгосрочно-переживающие культуры нейросетчатки глаза крыс и показать их эквивалентность сетчатке *in vivo*.
- 2) Продемонстрировать адекватность полученной модели на примере исследования реакций эксплантатов сетчатки на трофические факторы (BDNF, PEDF, эритропоэтин, ангиопоэтин) и препараты (Авастин<sup>TM</sup>, Церебролизин).
- 3) Получить культуры EGFP+ клеток (ММСК, НСПК, ПЭ) мышей линии C57BL/6-Tg(ACVB-EGFP)/Osb/J и провести их трансплантацию *in vitro* в интактные эксплантаты сетчатки с последующей оценкой миграции, распределения, и дифференцировки трансплантированных клеток на различных сроках после инъекции.

- 4) Разработать систему контролируемого лазерного повреждения сетчатки *in vitro* и оценить его влияние на поведение трансплантированных НСПК и ММСК, на основе чего провести оптимизацию способов трансплантации клеточного материала в поврежденную сетчатку глаза с целью наиболее эффективной репарации дефектов.
- 5) Исследовать процессы восстановления поврежденной нейросетчатки на функциональном уровне с применением НСПК и ММСК, оценить возможность функциональной интеграции трансплантированных клеток в поврежденную сетчатку глаза.

### **Научная новизна работы**

Оптимизирован протокол выделения и долгосрочного ведения эксплантационной культуры сетчатки. Показано продолжение морфологического разделения эксплантатов неонатальной сетчатки на слои и самоорганизация их клеток в примитивные нейрональные сети *in vitro*. Разработана адекватная модель для тестирования экзогенных трофических факторов и факторов роста на сетчатке глаза на примере эксплантационной культуры. Впервые проведена трансплантация НСПК и ММСК *in vitro* в различные слои нейросетчатки и подробно исследовано поведение инъецированных клеток непосредственно после введения. Получены уникальные данные по выявлению оптимального способа трансплантации различных типов клеток. Разработана оригинальная методика контролируемого повреждения сетчатки глаза при помощи инфракрасного лазерного излучения, проведено подробное исследование поведения и дифференцировки НСПК и ММСК, трансплантированных в поврежденные эксплантаты сетчатки глаза. Исследована возможность функциональной интеграции трансплантированных клеток в состав сетчатки глаза.

### **Научно-практическое значение работы**

Функциональная реабилитация сетчатки при патологиях различного генеза в настоящее время остается актуальной задачей. В данной работе использована адекватная модель развивающейся сетчатки глаза *in vitro* — органотипическая эксплантационная культура, которая позволила исследовать действия различных трофических факторов и последствия трансплантации стволовых клеток. Разработана методика *in vitro* трансплантации различных типов клеток в определенные слои эксплантата сетчатки, что позволило детально охарактеризовать микроокружение трансплантата и проследить поведение отдельных инъецированных клеток на разных сроках после введения. Выявлены различия миграционной активности и потенции к дифференцировке инъецированных клеток в зависимости от способа введения в органотипическую культуру сетчатки. Исследование процессов миграции и дифференцировки трансплантированных клеток при инъекции в органотипические культуры сетчатки позволило обосновать эффекты клеточной терапии, проводимой *in*

*in vivo* с целью репарации повреждений сетчатки. Полученные данные в дальнейшем позволят оптимизировать протоколы трансплантации клеток ПЭ, НСПК и ММСК, применимые в клинической практике. На основе анализа данных, полученных после трансплантации НСПК и ММСК в сетчатку, поврежденную лазерным излучением, показана возможность прогноза поведения этих клеток при их инъекции *in vivo* и дано обоснование некоторым неудачным попыткам восстановления зрительной функции после трансплантации.

### ***Основные положения, выносимые на защиту***

1. Органотипическая культура сетчатки является адекватной моделью развивающейся нейросетчатки глаза, сохраняет свой клеточный состав и гистологическую организацию клеток, реагирует на экзогенные факторы роста и дифференцировки аналогично сетчатке *in vivo*.
2. Место и способ трансплантации обуславливают распределение трансплантированных НСПК, ММСК и клеток ПЭ в сетчатке, организацию их в ассоциаты и дальнейшую дифференцировку. В отсутствие повреждения трансплантата основные изменения миграционной активности инъецированных клеток происходят в первые часы после введения, а сама миграция завершается к 3-м суткам после инъекции.
3. Повреждение сетчатки лазером стимулирует миграционную активность трансплантированных клеток (до 14 суток после инъекции), обладая мощным аттрагирующим эффектом, ускоряет их дифференцировку, приводит к морфологическому преобразованию ММСК в нейроноподобные клетки. Инъекция клеток в слои нейросетчатки или нанесение их на ее фоторецепторную поверхность (при моделировании протоколов, используемых в клинике) имеет принципиальное значение для реализации терапевтического действия трансплантированных клеток.

### ***Апробация работы***

Результаты работы были представлены на Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (2007, 2008, 2009, 2010, 2011), Москва; Международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (2007, 2008, 2009, 2010, 2011) Судак, Украина; Федоровских чтениях (2007, 2008), Москва; Школе-конференции для молодых ученых «Методы культивирования клеток» 2008, Санкт-Петербург; XV Школе «Актуальные проблемы биологии развития» 2008, Звенигород; Научно-практическом семинаре «Слушай музыку науки» Carl Zeiss 2008, Санкт-Петербург, Новосибирск; Научной школе-конференции «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования» 2009, Москва; Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи «Клеточные исследования и технологии в современной

биомедицине» 2009, Тула; III Международном симпозиуме "Актуальные вопросы клеточных технологий" 2010, Москва; VIII Всероссийской конференции по патологии клетки 2010, Москва; Всероссийской научной школе-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина» 2010, Москва; 6th International Heinrich F.C. Behr Symposium «Stem Cells and Cancer» 2010, Heidelberg, Germany; XX международной конференция Российской ассоциации репродукции человека 2010, Нижний Новгород; III Международной Студенческой Научно – практической Конференции с участием молодых ученых «Клинические и теоретические аспекты современной медицины» 2011, Москва; 5 международной конференции «Современные достижения бионаноскопии» 2011; 27 международной конференции European Society of Human Reproduction and Embryology Stockholm, Sweden, 2011; 7th Congress on Stem Cell Biology & Technology, Tehran – Iran; 2 международной конференции Stem Cells and Cancer (ICSCC) 2011, Pune, India. Работе присвоен диплом I степени на Научной школе-конференции «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования» 2009, Москва и диплом II степени на «Всероссийском конкурсе инновационных проектов и идей научной молодежи» 2011, Красновигово. Работа была поддержана индивидуальным грантом Carl Zeiss №2-15 и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы №П113.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 26 печатных работ, включая 7 статей (из них 6 - из списка журналов, утвержденного ВАК) и одно методическое пособие.

### **Структура и объем работы**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения и выводов изложена на 180 страницах машинописного текста, содержит 21 рисунок и 6 таблиц. Список литературы включает 260 работ.

### **Материалы и методы исследования**

**Получение культур сетчатки.** Для получения эксплантационной культуры сетчатки глаза по модифицированному протоколу [Kretc et al., 2007], использовали 4-х сут. самцов крыс *Wistar*. Эксплантаты помещали на поверхность чашки Петри, слоем фоторецепторов, обращенным наружу (Рис.1) и культивировали в течение 30 дней в стандартных условиях (+37°C, 5%CO<sub>2</sub>) в среде DMEM/F12 (НПП ПанЭко), с добавлением глутамин (Sigma, G-8540) и ИТС (НПП ПанЭко) 1:50, сыворотки FCS<sup>TM</sup> 7% (HyClone, SH30109.03), bFGF 10нг/мл и EGF по 10нг/мл (Sigma, E9644, F0291), гепарина (НПП ПанЭко), гентамицина 5мкл/1мл, добавок N2 (Gibco, 17502-048) 1:100 и B27 (Gibco, 17504044) 1:50. Клеточный состав и область разрастания эксплантатов оценивали при помощи сканирующей электронной микроскопии на микроскопе SAM Scan. Разделение клеток на типы по морфологическим признакам проводили согласно

работам [Сотников, 2008; Gibbons et al., 2007; Narayan et al., 2007; Rorke et al., 1975] на астроцитоподобные, микроглию [Hayes et al., 1988], протоплазматические и фиброзные астроциты [Estes et al., 1990], эндотелиальные клетки и фибробласты.

Для оценки действия факторов роста (ФР) в среду добавляли нейротрофический фактор мозга (BDNF), фактор пигментного эпителия (PEDF), для блокирования действия фактора роста эндотелия (VEGF) – препарат Бевацизумаб - Авастин™ (Genentech Inc., США) а для оценки комплексного действия экзогенных ФР - экстракт мозга свиньи «Церебролизин» (EVER Neuro Pharma) в концентрациях 5, 10, 50 и 100 нг/мл.

**Нанесение повреждения** проводили при помощи инфракрасного лазера (1480nm) Zilos-tk™ (Hamilton Thorne) миллисекундного диапазона мощностью 300 мВ, нагревающего поверхность в фокусе до 150°C. Повреждение сетчатки проводили 15-ю импульсами лазера длительностью 1000-3000 мс по квадрату со стороной 100 мкм на 14 сутки культивирования эксплантатов.

**Трансплантацию клеток** проводили стеклянным микрокапилляром (0,1 мкл среды) под биноклем Olympus CZX16 при помощи микроинъекционной приставки и на инвертированном микроскопе Nikon TE2000S, с микроманипуляторами и инъекторами Narishige (ММО-202<sup>ND</sup>, IM-9B, IM-H1, HD-21) и терморегулируемым столиком (Термо Plate) в зону разрастания клеток эксплантата на расстояниях 100 мкм, 1000 мкм и 3000 мкм от зоны повреждения. В эксплантаты инъецировали клетки EGFP<sup>+</sup> мышей линии C57BL/6-Tg(ACVB-EGFP)/Osb/J: нейральные стволовые/прогениторные клетки субвентрикулярной зоны 12 дневных плодов – НСПК 2-го пассажа; клетки стромы костного мозга новорожденных мышей - ММСК 2-6-го пассажа, выделенные по стандартному протоколу [Schrepfer et al., 2007]; клетки стромы жировой ткани - СКЖТ 4-го пассажа, выделенные согласно протоколу [Zuk et al., 2001]; клетки ПЭ 2-4-го пассажей, полученные после ферментативной обработки структур глаза.

**Атомно-силовая микроскопия.** АСМ-изображения были получены на атомно-силовом микроскопе Solver BIO Olympus (НТ-МДТ, Россия, Зеленоград), с полем сканирования 100x100x7 мкм<sup>3</sup> и системой емкостных датчиков. При скорости сканирования 0,3 – 1,5 Гц в полуконтактном и контактном режимах. Изображения были обработаны средствами программы Nova (НТ-МДТ, Россия, Зеленоград).

**Иммуногистохимический анализ (ИГХ)** дифференцировки трансплантированных клеток проводили с использованием антител к β-III-тубулину - anti-tubulin β III isoform antibody (Chemicon, МАВ1637), GP-45 (Abcam ab110898), рековерину – anti-recoverin antibody (Abcam ab31928), глиальному кислому фибриллярному белку - GFAP - anti-gial fibrillary acidic protein (Sigma G9269), фактору фон-Виллебранда – Von Willebrand Factor antibody (Abcam ab 6994) и к GSL-IB4 - Griffonia simplicifolia IB4 isolectin (Sigma L1509).

**Вестерн-блот анализ** экспрессии фактора фон-Виллебранда в эксплантатах сетчатки по методу Бредфорд с модификациями [Тахчиди и др., 2009] проводили на 14 сутки после добавления факторов роста.

**Методы прижизненного наблюдения.** Жизнеспособность трансплантата оценивали по включению мертвыми клетками йодида пропидия (PI) (Invitrogen, V13243, США). Контрастирование клеток эксплантата сетчатки для выявления возможности слияния с трансплантированными ММСК проводили флуоресцентным неспецифическим липофильным красителем Di-I (Invitrogen, C7001, США). Измерение реакции трансплантированных клеток на внешнее раздражение проводили с применением электростимулятора АСЛ-2 и потенциал-чувствительного красителя RH 795 (Invitrogen R-649, США), способного изменять спектр флуоресценции в зависимости от потенциала клеточной мембраны.

**Получение изображений** проводили с помощью инвертированного микроскопа NikonTE2000S, флуоресцентных изображений — с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus KX-100 с камерой Delta Pix 5000 и Axsiovert 25. Для получения пространственной картины распределения трансплантированных клеток в эксплантате применяли метод лазерной сканирующей конфокальной микроскопии на микроскопах Axsiovert 200LSM 510Meta (Carl Zeiss) и Leica TCS SPE с оригинальным программным обеспечением.

**Статистический анализ** осуществляли средствами программы STATISTICA 8.0. Наличие и достоверность различий между выборочными величинами независимых выборок оценивали при помощи непараметрического H-критерия Крускала-Уоллиса. Достоверность отличий между группами инъецированных клеток (ММСК, НСК, ПЭ) определяли при помощи метода Стьюдента-Ньюмана-Келса. Достоверность различий в индексе площади (ИП) — с помощью t-критерия Стюдента.

## **Результаты и обсуждение**

### **Морфологический анализ клеток выселяющихся из эксплантата сетчатки**

При помощи гистологических и электрономикроскопических методов в зоне разрастания эксплантата показано присутствие клеток, морфологически подобных астроцитам, олигодендроцитам, микроглии, биполярным нейронам, фибробластам и эндотелиальным клеткам. Продемонстрирована сохранность основных типов клеток, характерных для сетчатки *in vivo* наряду с сохранностью цитоархитектоники эксплантата и дальнейшей дифференцировкой ткани сетчатки. Возможность самоорганизации нейросетчатки с последующим подразделением на слои была продемонстрирована в экспериментальных системах *in vivo* во многих исследованиях [Katusis et al., 2008], а *in vitro* показана лишь в единичных работах на модели дезагрегированных культур клеток [Engelsberg, Ghosh, 2011; Eiraku et al., 2011].

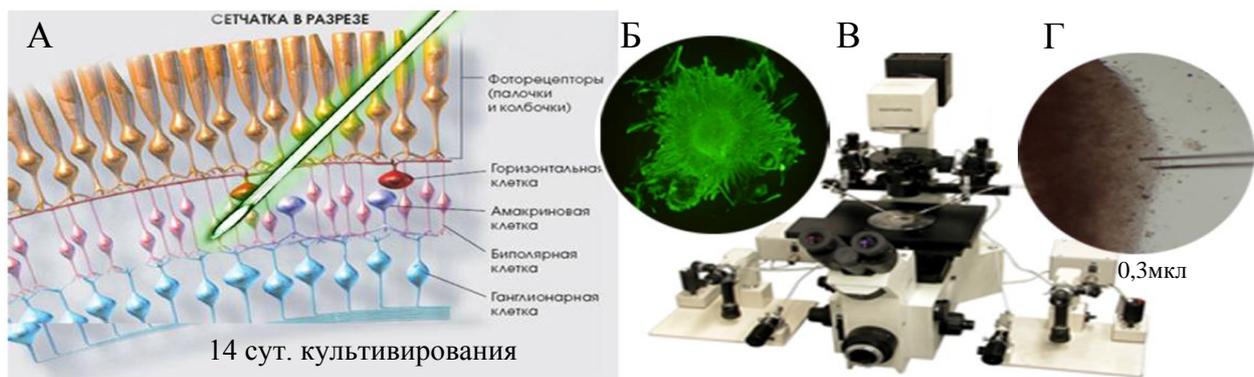


Рис.1. Схема проведения трансплантации клеток *in vitro* (А). Инъекция материала под контролем инвертированного микроскопа и микроманипуляторов (В) в среднюю область края разрастания эксплантата сетчатки (Б) стеклянным капилляром (Г) в объеме среды 0,3мкл.

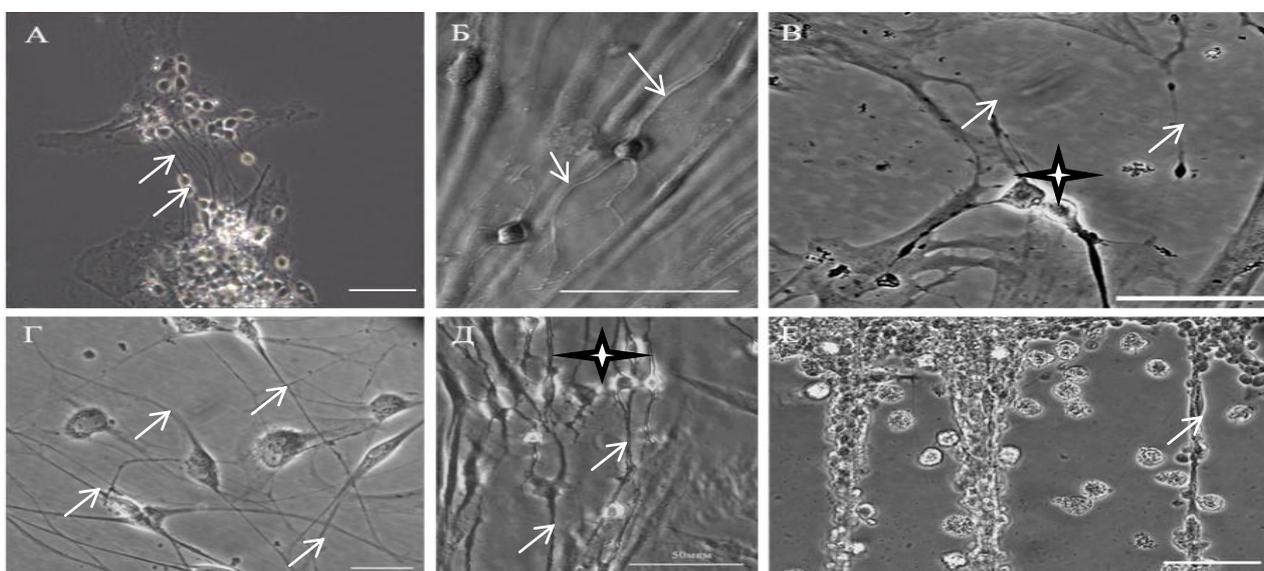


Рис.2. Миграция клеток, образование ими нейроноподобных отростков (стрелка) и ассоциатов (звездочка) под действием факторов роста. А-BDNF; Б-Авастин<sup>TM</sup>; В-Церебролизин; Г-Эритропоэтин; Д,Е-PEDF. Масштабный отрезок А-В,Д-50мкм, Г-10мкм, Е-100 мкм.

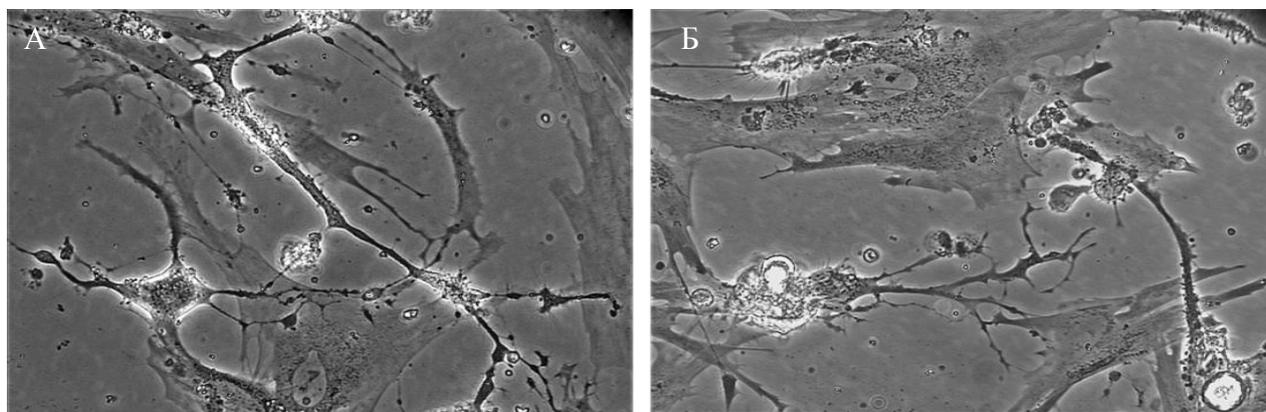


Рис.3. Спонтанная организация выселившихся из эксплантата сетчатки клеток в примитивные нейрональные сети типа диффузного плексуса и микроганглиев (указаны звездочкой) под действием 50нг/мл (А) и 100нг/мл (Б) Церебролизина. Масштабный отрезок 50мкм.

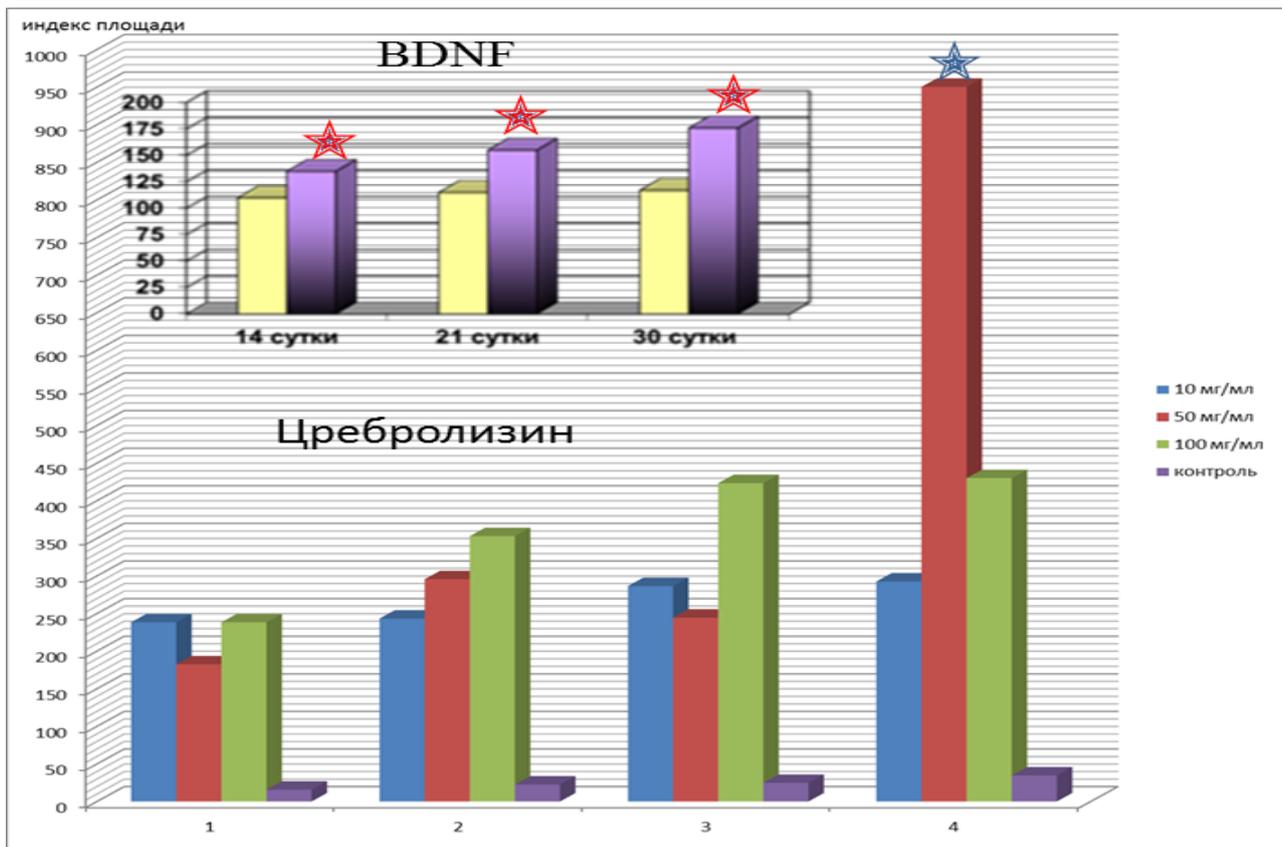


Рис.4. Индекс площади при культивировании эксплантатов сетчатки в присутствии 100нг/мл BDNF и различных концентраций Церебролизина. Достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) с контрольной группой указаны звездочками.

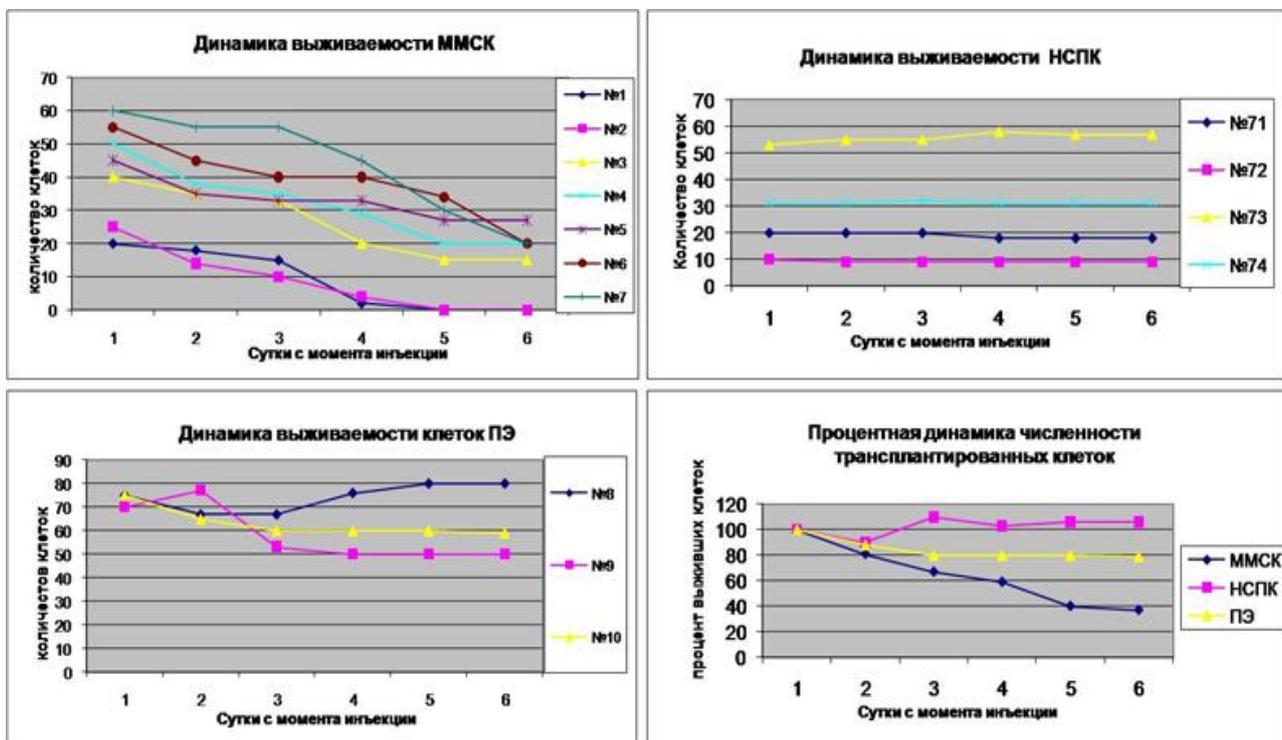


Рис.5. Динамика выживаемости ММСК, НМПК и клеток ПЭ, инъецированных в эксплантат сетчатки. Подсчет численности живых клеток проводился с периодичностью в сутки в течение 6 дней эксперимента по отсутствию включения PI.

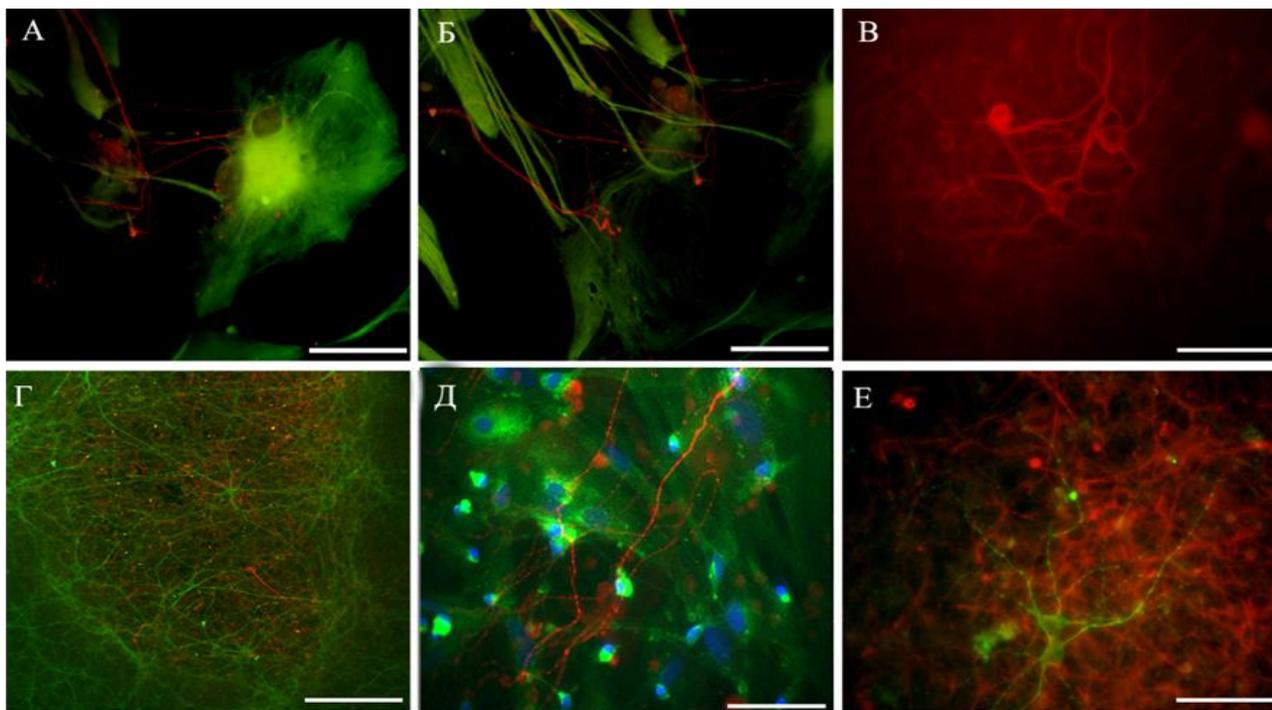


Рис.6. Экспрессия маркеров дифференцировки клетками эксплантатов сетчатки при культивировании с факторами роста: А-В-BDNF ( **$\beta$ -III-тубулин**; **GFAP**); Г-PEDF; ( **$\beta$ -III-тубулин**; **GFAP**); Д-Церебролизин (**GSL-IB4**; **GFAP**; **Hoechst. 33342**); Е-Авастин™ ( **$\beta$ -III-тубулин**; **GFAP**). Масштабный отрезок А-В-10мкм, Г-100мкм, Д,Е-30мкм.

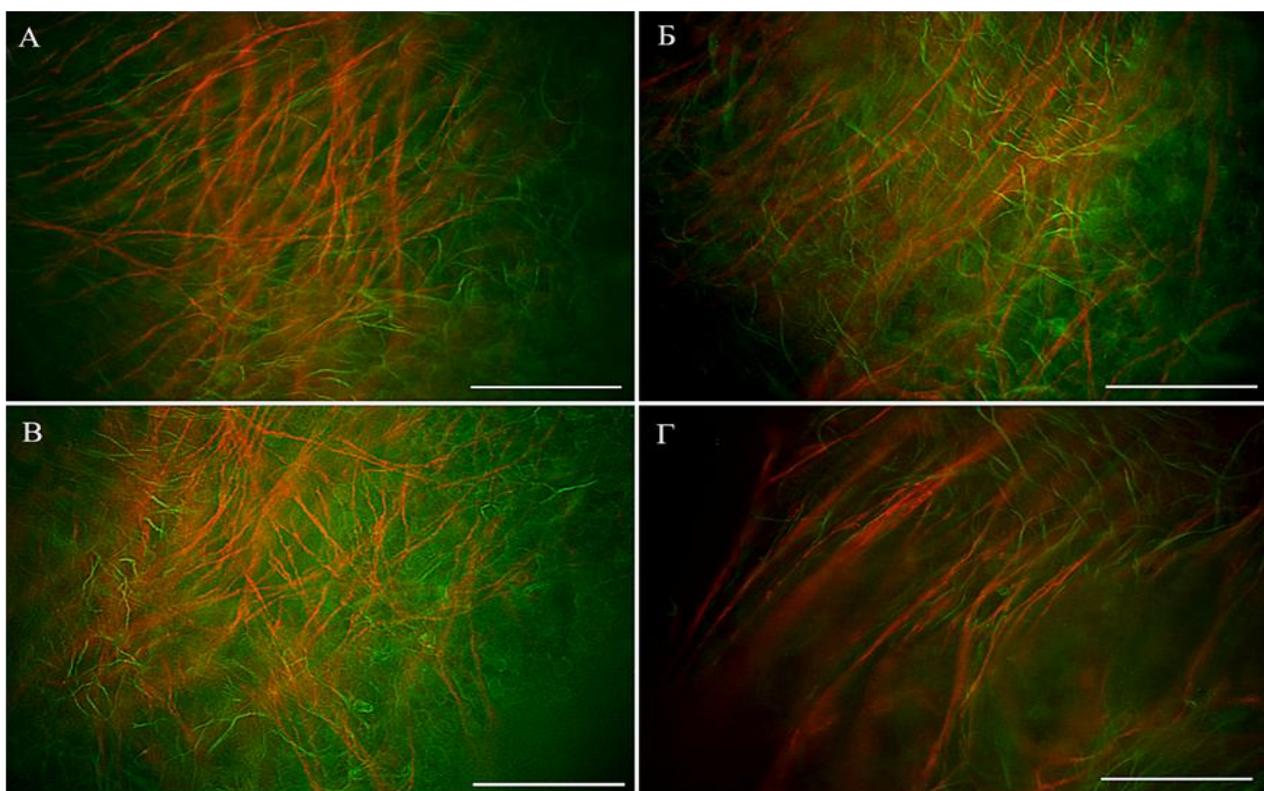


Рис.7. Изменение соотношения экспрессии **GFAP** и **GP45** в сетчатке *in vitro* при концентрации Церебролизина 10нг/мл (А); 50нг/мл (Б); 100нг/мл (В), достоверно ( $p < 0,05$ ) отличные от контроля (Г). Масштабный отрезок 50мкм.

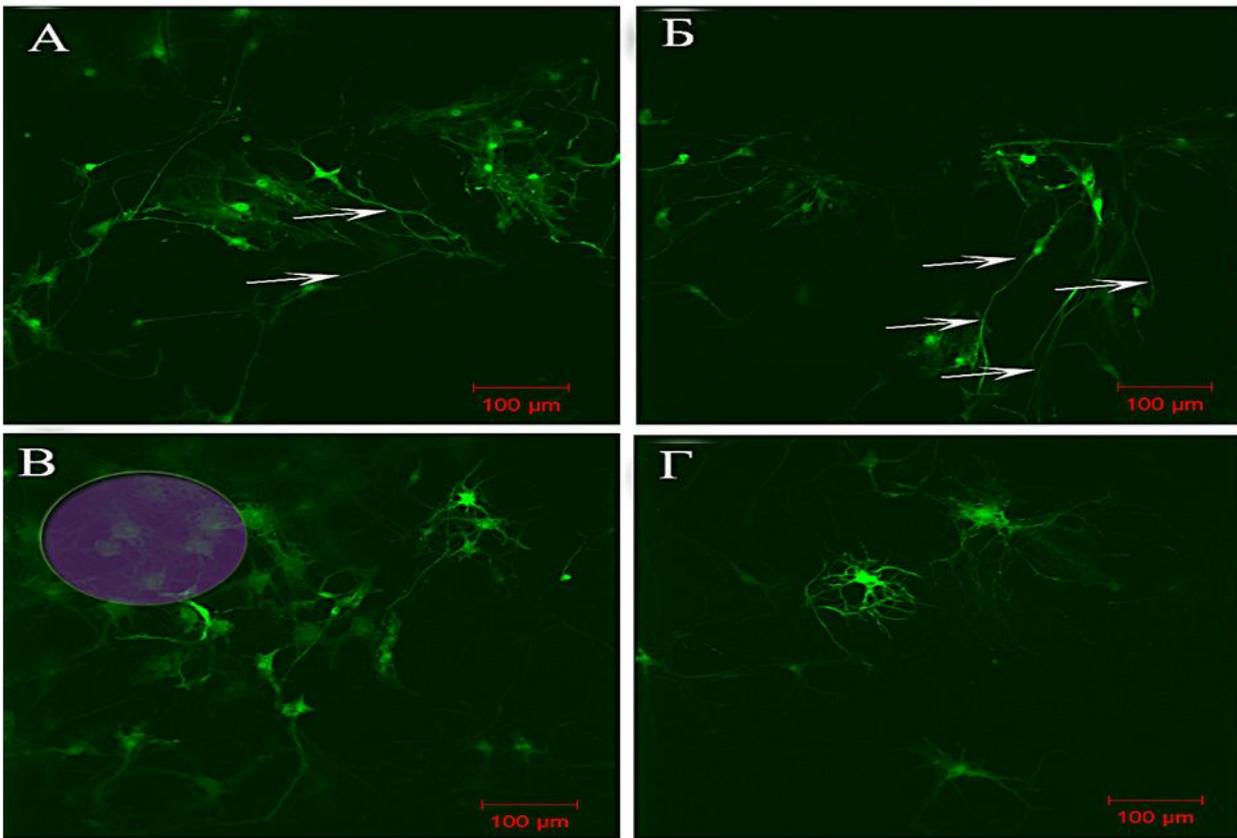


Рис.8. Миграция EGFP+ НСПК от зоны инъекции к области травмы (указана овалом). А,Б – направленный рост отростков к зоне повреждения (указан стрелкой); В- заселение зоны повреждения; Г-контроль.

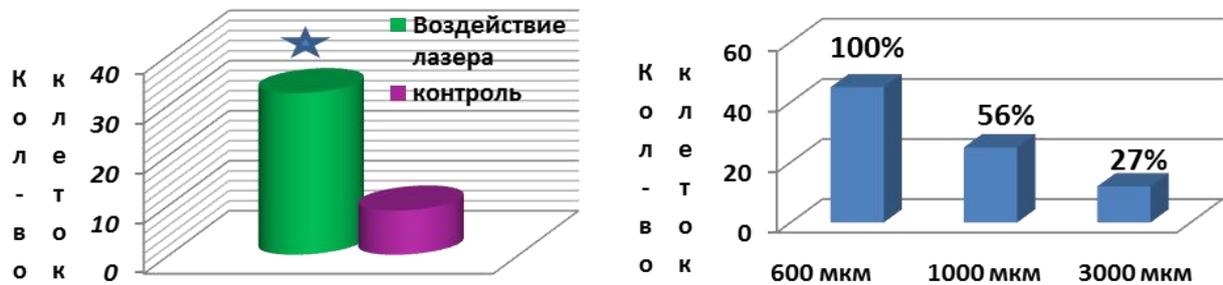
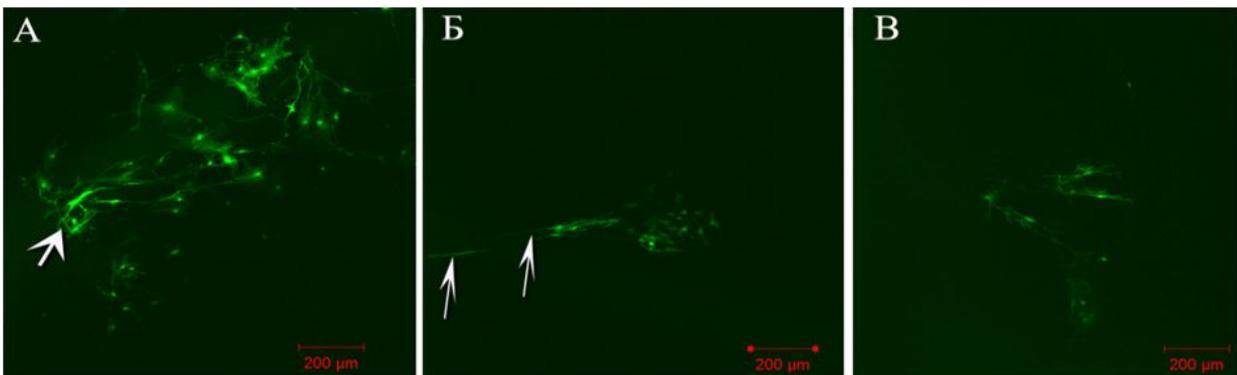


Рис.9. Поведение трансплантированных НСПК при наличии нескольких зон повреждения на одном эксплантате, удаленных на различное расстояние от области инъекции клеток (А-600мкм; Б-1000мкм; В-3000мкм). Направленный рост отростков к мету травмы указан стрелкой. Звездочка – достоверные отличия в количестве клеток в зоне повреждения и в интактном эксплантате -  $p < 0,05$ .

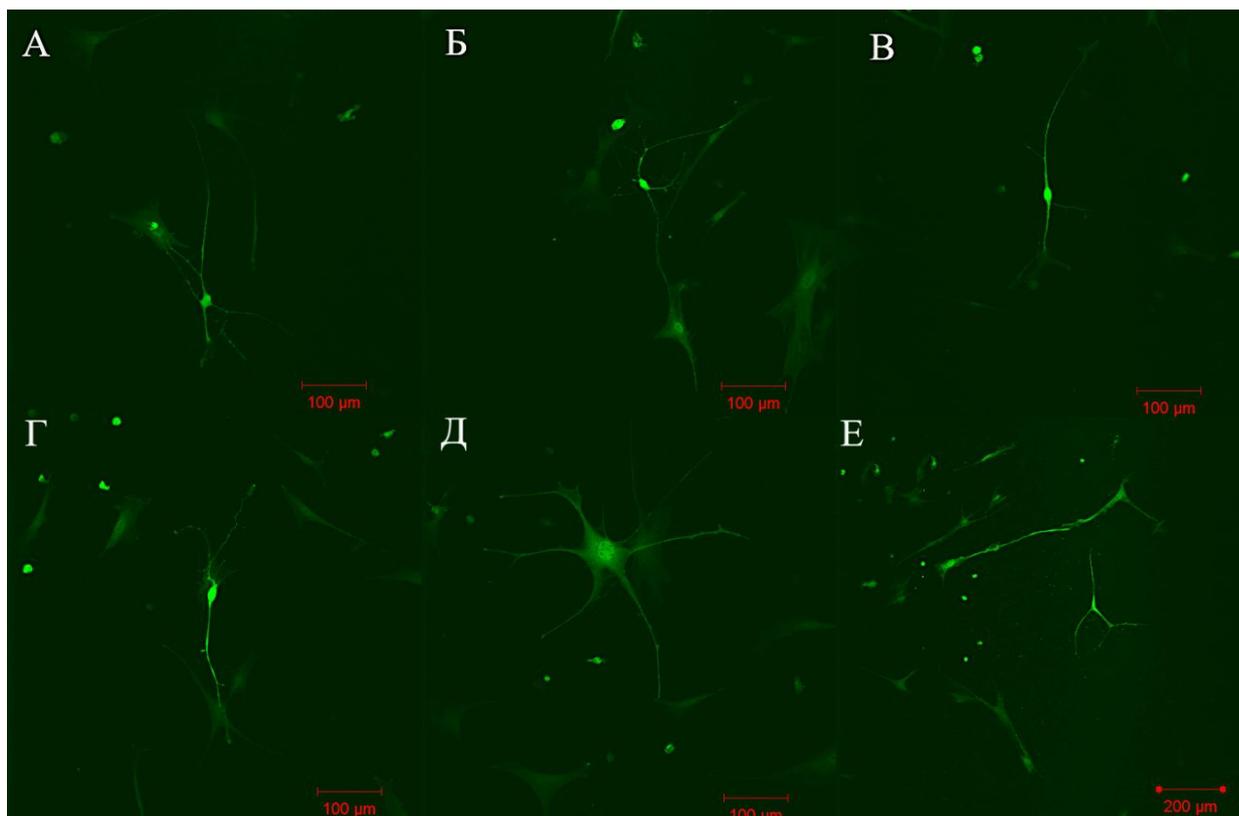


Рис.10. Изменение морфологии трансплантированных **EGFP+** ММСК в эксплантате сетчатки, поврежденном лазерным излучением. А-Г-приобретение нейрональной морфологии инъецированными ММСК. Д-Е-дифференцировка инъецированных ММСК по глиальному фенотипу.

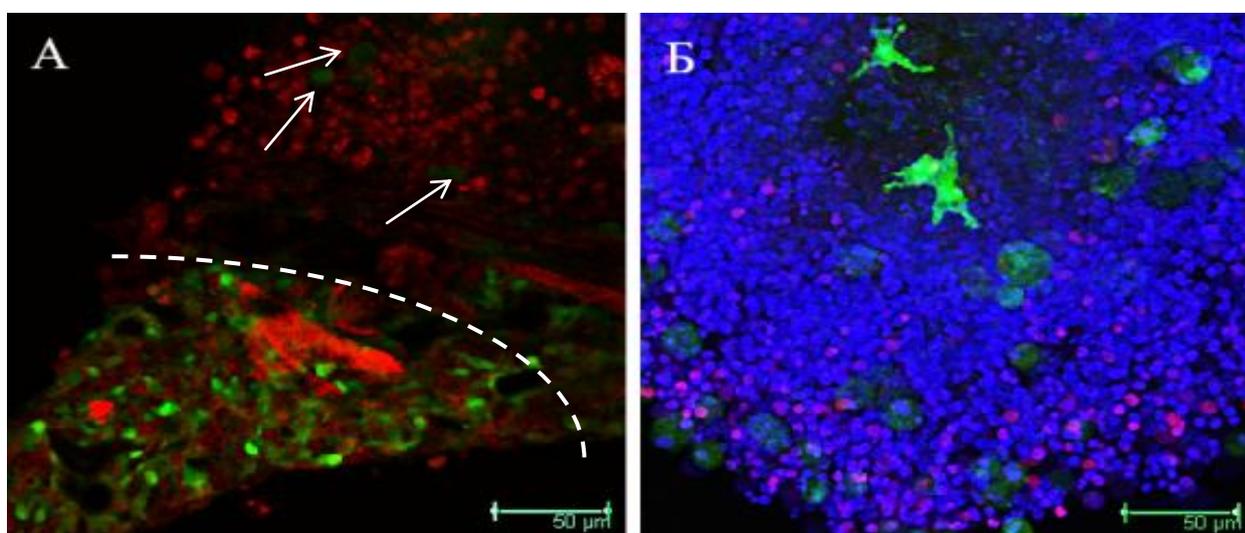


Рис.11. Сокультивирование **EGFP+** ММСК с сетчаткой глаза. А-эксплантационное сокультивирование – моделирование супрахориоидальной трансплантации, сетчатка окрашена маркером **Di-I**. Пунктиром показана граница экспантата и агрегата ММСК, стрелками - ММСК, проникшие в сетчатку; Б-НД сокультивирование ММСК в течение 14-ти суток с дисперсной культурой сетчатки – миграция единичных клеток в сетчатку; выявление мертвых клеток по включению **PI**, ядра контрастированы бисбензими́дом (**Hoechst. 33342**) .

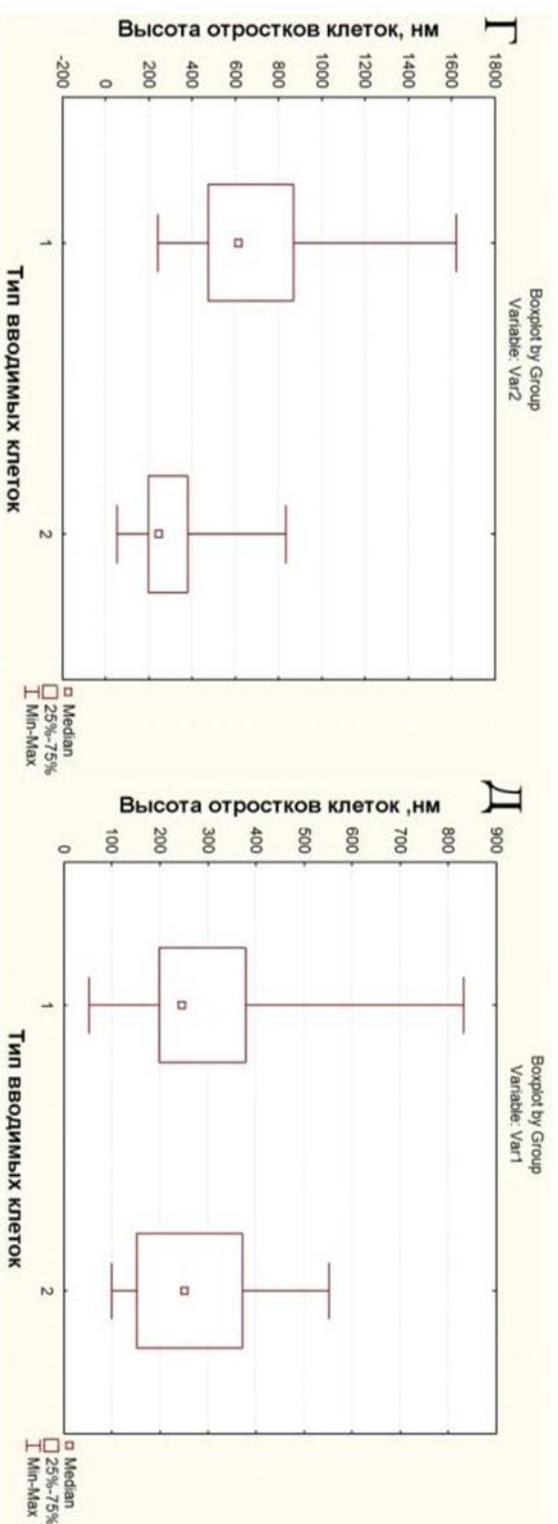
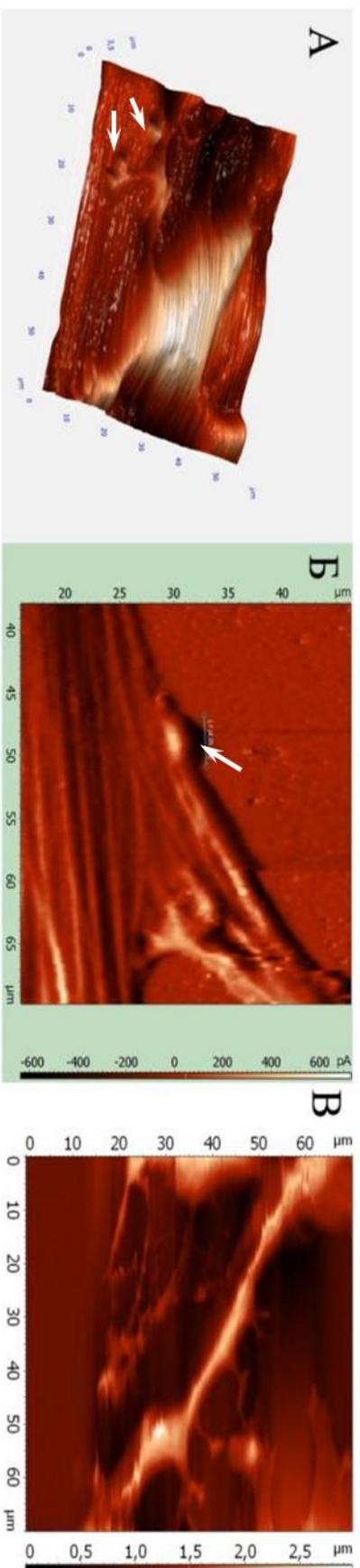


Рис. 12. АСМ анализ поверхности иньецированных ММСК, проводимый в контактном и полуконтактном режимах.

А – Реконструкция поверхности ММСК, изменившей свою морфологию. Б – образование синаптических контактов (указаны стрелкой) между трансплантированными ММСК и клетками сетчатки. В – начало выселения клеток из эксплантата, образование ламеллоподий. Г – количественный анализ распределения высот отростков – 1 группа глияльные клетки эксплантата сетчатки, 2 группа – отростки трансплантированных ММСК ( $p < 0,01$ ). Д - количественный анализ распределения высот отростков – 1 группа клеток нейрональные клетки эксплантата сетчатки, 2 группа – отростки трансплантированных ММСК ( $p > 0,01$ ).

В данной работе эта способность клеток нейросетчатки впервые показана на модели эксплантационной культуры.

При помощи методов АСМ было показано, что выселению клеток из эксплантата сетчатки предшествовало образование ламеллоподиальных выростов цитоплазмы краевых клеток эксплантата на 3-й день культивирования, средняя длина которых составила  $10,09 \pm 2$  мкм, а средний диаметр –  $3,68 \pm 0,5$  мкм. К 7-м суткам наблюдалось увеличение протяженности отростков, средняя длина которых составила  $21,65 \pm 5$  мкм, а средний диаметр –  $0,78 \pm 0,23$  мкм. По поверхности глиальных (GFAP+) и эндотелиальных (GSL-IB4+) клеток происходило распространение нейритов, длина которых достигала нескольких миллиметров и диаметр до 0,47 мкм. При сравнении высот отростков было показано достоверное отличие ( $p < 0,01$ ) в величине отростков, формируемых глиальными и эндотелиальными компонентами сетчатки в начале выселения из кусочка сетчатки и высотами отростков нейронов, распространяющихся по выселившимся клеткам.

### ***Влияние трофических факторов на эксплантационную культуру сетчатки***

В 3-х сериях экспериментов, включавших по 30 образцов каждая, были подобраны оптимальные концентрации добавляемых ФР, составившие 100 нг/мл для BDNF, PEDF, и препаратов Церебролизина и 2,5 нг/мл для Авастина<sup>TM</sup>. В среде с добавлением Авастина<sup>TM</sup> изменения клеточной миграции и дифференцировки нейронов происходили значительно быстрее, чем в контрольных группах (Рис. 2Б). Через 3-е суток после введения в среду BDNF и PEDF в концентрации 100 нг/мл наблюдалась стимуляция миграционной активности нейроноподобных клеток и радиальное распространение их асинаптических дендритов (Рис. 2А, Д, Е).

Под действием Церебролизина (10, 50 и 100 нг/мл) нейральные клетки формировали ассоциаты, в виде диффузного плексуса, а затем, при концентрации препарата 50 и 100 нг/мл, переходившие в плексусно-ганглионарные нервные сплетения (Рис.3). При добавлении 100 нг/мл Церебролизина наблюдалось формирование микроганглиев из 2-5 клеток (Рис. 2В). Под влиянием Церебролизина на ранних сроках культивирования нейроны образовывали широкие ламеллы с шипиковидными выпячиваниями, которые позже в результате изометрического сокращения переходили в ампулярные сплетения. Большинство клеток имело биполярное расположение отростков, однако единичные нейроны выпускали разветвленные дендриты, местами соединенные коллатеральными, и приобретали мультиполярность. Глиальные и эндотелиальные клетки сильно распластывались и пролиферировали, что приводило к образованию эпителиоподобного слоя на дне чашки для культивирования. При подсчете ИП разрастания эксплантатов под действием Церебролизина было обнаружено достоверное отличие ( $p < 0,05$ ) ИП на первый день добавления препарата и на 28-е сутки культивирования с Церебролизином, а также достоверные отличия ИП эксплантатов в опытных группах

( $P < 0,05$ ) на всех сроках культивирования для всех концентраций препарата по сравнению с контрольной группой (Рис.4). Аналогичные результаты изменения ИП показаны и при культивировании сетчатки с BDNF в концентрации 100 нг/мл.

В ходе ИГХ исследования в зоне расселения эксплантата было показано наличие большого числа нейрональных клеток, имеющих  $\beta$ -III-тубулин и GP45 позитивные нейриты (Рис.6). В процессе миграции клеток из эксплантата распространение нейрональных клеток происходило по поверхности GFAP+ глиальных и GSL-IB4+ эндотелиальных клеток. При анализе соотношения GP45+ и GFAP+ отростков клеток в культуре с добавлением Церебролизина было обнаружено дозозависимое увеличение количества нейрональных отростков в общем пуле асинаптических дендритов зоны расселения (Рис.7).

Стимуляция выселения нейрональных клеток из эксплантата происходила и при добавлении в среду ангиогенных ФР: ангиопоэтина и эритропоэтина (Рис. 2Г), способствующих сохранению одного из основных нише-образующих компонентов сетчатки глаза – клеток эндотелия микрокапилляров (GSL-IB4+ клеток).

Данные по влиянию указанных ФР, полученные в экспериментах *in vitro* прекрасно согласуются с аналогичными ранее проведенными исследованиями по введению этих же ФР в нативную и поврежденную сетчатку крыс, мышей и кроликов. *in vivo* [Робустова и др., 2003].

### ***Трансплантация клеток в сетчатку in vivo***

На основании электроретинограммы (ЭРГ) крыс линии *Campbell* установлено, что клетки ПЭ как при интравитриальной (60 000-100 000 клеток в 2мкл), так и ретробульбарной (300 000 в 10мкл) трансплантации через 4 и 6 суток оказывают слабоположительное влияние на функциональное состояние сетчатки крыс *Campbell* возраста 25 суток. Трансплантация 100 000 клеток ПЭ позволяет сохранить функциональную активность сетчатки у крыс до 36 суток. Статистически достоверно увеличивается толщина ONL у опытных животных 27-х и 43-х суток. При супрахориоидальной трансплантации клеток ПЭ (300 000 клеток в 2мкл или 150 000 клеток в 1мкл) отмечено замедление процессов дегенерации, развивающихся в ONL и сохранение высокого уровня функциональной активности сетчатки. При супрахориоидальной трансплантации НСПК (300 000 клеток в 2мкл или 150 000 клеток в 1мкл) функциональная активность сетчатки животных была в 3 раза ниже, чем при аналогичной трансплантации клеток ПЭ, несмотря на статистически неразличимые морфологические данные толщины ONL.

### ***Трансплантация клеток в сетчатку in vitro, поврежденную инфракрасным лазерным излучением***

При воздействии лазерного излучения наблюдалось изменение структуры ткани в области фокуса луча, сопровождающееся потемнением цитоплазмы клеток,

их интенсивной вакуолизацией и коагуляцией межклеточного матрикса. Повреждение лазером приводило к утрате клеточных взаимосвязей и изменению морфологии клеток, завершающихся их гибелью, и носило необратимый характер.

При нанесении на поверхность поврежденного эксплантата сетчатки НСПК (моделирование супрахориоидальной трансплантации *in vivo*) практически отсутствовали их миграционная активность и процессы нейрональной дифференцировки. В результате в популяции трансплантированных клеток присутствовали лишь единичные  $\beta$ -III-тубулин+ клетки. Данное наблюдение позволяет объяснить факт незначительного терапевтического эффекта трансплантированных НСПК в клинической практике при супрахориоидальной или ретробульбарной инъекции. При инъекции НСПК вглубь слоев нейросетчатки трансплантированные клетки активно мигрировали в первые 24 часа. Сравнительный анализ зависимости количества активно мигрирующих клеток на различных сроках после введения показал, что при трансплантации непосредственно после нанесения травмы или через сутки наблюдается наибольшая миграционная активность клеток, а при трансплантации через 7 суток после воздействия лазера интенсивность миграции инъекционных клеток практически не отличалась от контрольных образцов (трансплантация клеток без нанесения травмы). Распространение НСПК в эксплантате, поврежденном лазером, происходило на расстояния, превышающие 5мм, от места трансплантации вдоль вектора, направленного к области травмы, и составляло всего около 1мм в противоположном направлении. На 3-е сутки после трансплантации НСПК было проведено сравнение их количества в зоне между местом трансплантации и местом лазерного повреждения и их количества на таком же расстоянии от места введения, но в противоположном направлении (подсчет проводился в одном поле зрения). Статистическая обработка результатов подсчета НСПК, по критерию Манна-Уитни показала достоверно большее ( $p < 0,01$ ) количество клеток, мигрирующих от зоны трансплантации в область лазерного повреждения. При достижении зоны повреждения происходила остановка миграции НСПК, и начиналось образование ими густой сети асинаптических дендритов, распространяющихся во всех плоскостях, а так же агрегация трансплантированных клеток друг с другом (Рис.8). Первые клетки, пришедшие в зону воздействия лазера, были обнаружены уже через 1 час после трансплантации при введении их на расстоянии 100мкм от зоны повреждения, через 12 часов — при инъекции на расстоянии в 500мкм и через 3-5 суток — при дальних областях трансплантации (>1000мкм). Наиболее активное привлечение клеток в поврежденную область происходило на протяжении первых 3-х суток после создания дефекта сетчатки и резко угасало в последующие.

При исследовании распределения трансплантированных НСПК в эксплантате с несколькими зонами лазерного повреждения, находящимися на различном

расстоянии от места инъекции (600, 1000 и 3000мкм), было показано заселение трансплантированными клетками всех зон через 7 суток после инъекции. Однако происходило уменьшение количества клеток в зонах повреждения, по мере их удаления от области введения. При удалении зоны повреждения от зоны введения на 1000 и на 3000мкм клеточные популяции, детектируемые в поле зрения, включающем поврежденный лазером участок, составили 56% и 27% соответственно от количества клеток зоны, удаленной на 600мкм (Рис.9).

В работе было применено 2 метода внесения ММСК в культуру сетчатки: непосредственная инъекция вглубь средней зоны края разрастания эксплантата и поверхностное нанесение клеток. В случае первого ММСК непосредственно контактировали с нейрональной составляющей сетчатой оболочки глаза, второй имитировал супрахориоидальную инъекцию ММСК *in vivo*. Для трансплантированных ММСК было отмечено образование двух характерных фенотипов: глиального с ламеллоподиальными выростами цитоплазмы и крупным ядром с хорошо различимыми ядрышками и нейрональноподобного с длинными тонкими ветвящимися отростками, имеющими ампулярные расширения с оформленным компактным телом клетки (Рис.10). Нейритоподобные выросты ММСК проникали вглубь эксплантата сетчатки, образовывали анастомозы и контактировали с другими трансплантированными клетками и нейронами самого эксплантата. Таким образом, трансплантированные ММСК, попадая в нейрональное микроокружение сетчатки, имели сходное поведение с инъекционными НСПК. Аналогичные результаты были получены с использованием сокультивирования ММСК и агрегатов клеток сетчатки, сформированных в системе висячих капель (HD) и в роллерной установке, где происходило внедрение стволовых клеток вглубь слоев агрегата через 2-е суток и их дифференцировка (Рис.11). В HD культуре ММСК занимали преимущественно центральное положение в агрегате в окружении ганглиозных клеток сетчатки, в то время как в роллерной системе располагались диффузно во всех слоях. При использовании стандартной методики сокультивирования различных типов клеток [Johnson, Martin, 2008] наблюдали незначительное проникновение ММСК вглубь слоев нейросетчатки и отсутствие изменения их фенотипа. Аналогичные результаты по изменению морфологии, выживаемости и миграционной активности трансплантированных клеток в различных системах культивирования были получены и при выделении клеточной популяции мезенхимных стволовых клеток из жировой подкожной клетчатки (СКЖТ).

Однако, в отличие от НСПК, способ введения ММСК не влиял на активность миграции трансплантируемых клеток, их перемещение не было аттрагировано к области травмы. Как при нанесении на поверхность, так и при инъекции вглубь поврежденного 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 распределения введенных клеток, занятия ими новых ниш. При нанесении повреждения эксплантату, ММСК быстрее изменяли свою морфологию по сравнению с клетками, введенными в контрольные образцы, без повреждения воздействием лазера. В этой серии экспериментов морфологические изменения ММСК детектировали спустя 24 часа после инъекции, в то время как в контроле лишь через трое суток. Эти данные позволяют сделать предположение, что для морфологической дифференцировки трансплантированных клеток, отвечающей условиям их нового микроокружения, чрезвычайно важны регуляторные факторы, высвобождающиеся при гибели клеток в районе нанесения повреждения.

Поведение после инъекции в ONL высококодифференцированных клеток ПЭ значительно отличалось от поведения клеток с широкими потенциями к дифференцировке. Наблюдалась хорошая выживаемость клеток, но изменения морфологии клеток ПЭ отсутствовали даже после длительного (до 2-х месяцев) культивирования после инъекции в эксплантат. Для них была характерна небольшая миграционная способность, сопоставимая с таковой для самих клеток эксплантата. При поверхностном нанесении клеток ПЭ на эксплантат сетчатки (моделирование супрахориоидальной инъекции *in vivo*) их пролиферация сильно активировалась и уже через 3-е суток они образовывали монослой на поверхности сетчатки.

С использованием критерия Крускала-Уоллиса было показано достоверно лучшая ( $p < 0,05$ ) выживаемость НСПК и клеток ПЭ по сравнению с ММСК на 1-е и 2-е сутки в эксплантатах без повреждения; а также на 5-е и 6-е сутки после трансплантации. При введении более 100 клеток, при помощи теста Стьюдента-Ньюмана-Келса была продемонстрирована достоверно лучшая ( $p < 0,05$ ) выживаемость клеток ПЭ по сравнению с ММСК и НСПК начиная с первого дня культивирования, и отсутствие статистически значимого отличия ( $p > 0,05$ ) в выживаемости между ММСК и НСПК. Данная тенденция появления различий в выживаемости клеток ПЭ и стволовых клеток сохранялась в течение 6 суток после трансплантации (Рис.5).

При помощи анализа поверхности трансплантированных клеток методами АСМ было показано отсутствие достоверных отличий ( $p > 0,05$ ) в средней квадратичной шероховатости поверхности трансплантированных ММСК, изменивших свою морфологию на нейроноподобную и нейронов сетчатки, а так же отсутствие достоверных отличий ( $p > 0,05$ ) при сравнении асимметрии распределения отростков трансплантированных НСПК и нейронов эксплантата сетчатки. Не удалось выявить достоверных различий и в размахе высот отростков между трансплантированными ММСК, изменившими морфологию, и нейронами сетчатки. Однако были обнаружены достоверные различия ( $p < 0,01$ ) высот нейритоподобных отростков ММСК и высот отростков глиальных и эндотелиальных клеток сетчатки

(Рис.12). Таким образом, присутствуют фактические различия в пространственной организации отростков нейроноподобных ММСК и отростков ненейрональных клеток сетчатки.

Важным критерием заместительной клеточной терапии является функциональное преобразование трансплантированных клеток и приобретение ими возможности реагировать на внешнее раздражение изменением мембранного потенциала. При помощи потенциал-чувствительного красителя R495 (Invitrogen) была продемонстрирована способность некоторых трансплантированных ММСК, изменивших свою морфологию на нейроноподобную, реагировать на прилагаемое внешнее электромагнитное поле частичной либо полной деполяризацией мембраны. Количество таких ММСК составляет не более 0,1% от общего числа трансплантированных клеток.

Некоторые исследователи связывают такой низкий процент трансдифференцировки трансплантированных ММСК с происходящими единичными случаями слияния инъецированных клеток с клетками ткани реципиента [*Alvarez-Dolado et al., 2003*]. Для исследования этой гипотезы в эксплантаты сетчатки, предварительно окрашенные липофильным красителем Di-I (Invitrogen), были инъецированы EGFP+ ММСК. При исследовании образцов методами конфокальной микроскопии не было обнаружено ни одной клетки, имеющей двойную окраску (Di-I+; EGFP+) даже при культивировании более 2-х месяцев. Данный факт позволяет предположить возможность нахождения среди трансплантированных клеток очень небольшой популяции ММСК-подобных клеток, способной к истинной функциональной трансдифференцировке в нейроноподобные элементы.

## **Выводы**

1. Получены эксплантационные культуры сетчатки, которые сохраняют гистотипическую организацию ткани и ее клеточный состав при культивировании *in vitro* до 2-х месяцев.
2. Эксплантаты сетчатки реагируют на введение трофических факторов (BDNF, PEDF, эритропоэтина, ангиопоэтина) и препаратов (Авастина<sup>TM</sup>, Церебролизина) усилением процессов миграции клеток края разрастания, ускорением их дифференцировки, увеличением жизнеспособности нейрональных клеток и самоорганизацией выселившихся нейронов в примитивные нервные сети.
3. При трансплантации *in vitro* ММСК, НСПК и клеток ПЭ в эксплантаты сетчатки с первых часов до 3-х суток наблюдается активная миграция инъецированных клеток от места их введения.
4. Показано, что определяющим фактором дифференцировки трансплантированных *in vitro* клеток является их новое микроокружение: ММСК приобретают только нейроноподобную морфологию, в то время как НСПК приобретают иммуноцитохимические маркеры дифференцирующихся нейронов.
5. Разработана методика контролируемого повреждения эксплантатов сетчатки инфракрасным лазерным излучением, показано усиление миграционной активности трансплантированных клеток в направлении нанесенного дефекта, а так же ускорение их дифференцировки по сравнению с сетчаткой без травмы.
6. При трансплантации клеток в эксплантаты сетчатки после нанесения лазерного повреждения показана зависимость интеграции клеток от способа их трансплантации: для НСПК и ММСК оптимальным являлось их введение во внутренний ядерный слой эксплантата сетчатки, а для клеток ПЭ – нанесение на его поверхность.
7. Показано, что для эффективного встраивания клеток в состав сетчатки в месте повреждения, их трансплантация должна быть произведена не позднее, чем через сутки после нанесения повреждения.
8. Показана принципиальная возможность заместительной интеграции трансплантированных НСПК и ММСК в поврежденную область сетчатки глаза, однако в последнем случае лишь 0,1% клеток, претерпевает истинную трансдифференцировку и приобретает способность к функциональной репарации дефектов.

## Список публикаций по теме диссертации

### Статьи:

1. Тахчиди Х.П., Гаврилова Н.А., Ланевская Н.И., Тищенко О.Е., Сабурин И.Н., Сергеев С.А., Павлова Г.В., Рыбалкина Е.Ю., Ревещин А.В. Влияние Авастина и фактора пигментного эпителия (PEDF) на состояние органотипических культур сетчатки // Объединенный медицинский журнал. 2008. – Т. 217. С. 43-48.
2. Гаврилова Н.А., Ланевская Н.И., Бакаева Л.М., Борзенко С.А., Шацких А.В., Сабурин И.Н., Сергеев С.А., Павлова Г.В., Рыбалкина Е.Ю., Ревещин А.В. Влияние нейротрофического фактора мозга - BDNF на органотипические культуры сетчатки. // Офтальмохирургия. 2009. №1. С.44-48.
3. Тахчиди Х.П., Гаврилова Н.А., Ланевская Н.И., Тищенко О.Е., Сабурин И.Н., Сергеев С.А., Павлова Г.В., Рыбалкина Е.Ю., Ревещин А.В. Сравнительная характеристика влияния фактора пигментного эпителия (PEDF) и Авастина на органотипические культуры сетчатки. // Офтальмохирургия. 2009. №4. С.45-50.
4. Сергеев С.А., Горкун А.А., Сабурин И.Н., Ревещин А.В., Семенова М.Л. Исследование распространения и дифференцировки трансплантированных клеток методами конфокальной микроскопии. // Сборник научно-практических статей молодых ученых ВУЗов России - победителей в конкурсе на соискание грантов Carl Zeiss в 2009 году «Инновационные методы исследования в биологии, материаловедении и нанотехнологиях при помощи высокотехнологичного оборудования». Москва. 2010. С.107-114.
5. Семенова М.Л., Сергеев С.А., Сабурин И.Н., Кошелева Н.В. Использование органотипической культуры сетчатки как модели для исследования миграционной активности трансплантированных клеток. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2010. Т.V. №2. С.55-61.
6. Сергеев С.А., Павлова Г.В., Тахчиди Х.П., Гаврилова Н.А., Ревещин А.В., Сабурин И.Н., Ланевская Н.И., Иванова З.Г., Бастаков В.А., Комова О.Ю., Орлов О.Ю. Влияние стволовых/прогениторных клеток на функциональное состояние и степень выраженности дегенеративных изменений сетчатки у крыс линии Campbell. // Офтальмохирургия. 2010. N 3. С.33-38.

7. Тахчиди Х.П., Гаврилова Н.А., Комова О.Ю., Ланевская Н.И., Иванова З.Г., Сабурин И.Н., Сергеев С.А., Павлова Г.В., Ревещин А.В., Орлов О.Ю., Бастаков В.А. Экспериментальное изучение эффективности клеточной трансплантации при наследственной пигментной дегенерации сетчатки. // Dentalforum. 2010. N.1. С.56-62.

***Тезисы докладов:***

8. Сергеев С.А., Кошелева Н.В. Дифференцировка нейронов в эксплантатах сетчатки крысы и человека под действием нейротрофического фактора головного мозга. // Тезисы докладов Ломоносов 2007. Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых. Москва 2007. С.197-198.
9. Сергеев С.А., Кошелева Н.В., Бакаева Л.Н., Ревещин А.В., Семенова М.Л., Сабурин И.Н. Влияние нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) на эксплантаты сетчатки крысы и человека in vitro. // Нейронаука для медицины и психологии. Третий международный междисциплинарный конгресс. Москва 2007. С.209-211.
10. Гаврилова Н.А., Ланевская Н.И., Бакаева Л.М., Борзенков С.А., Павлова Г.В., Ревещин А.В., Рыбалкина Е.Ю., Сабурин И.Н., Сергеев С.А. Влияние нейротрофического фактора головного мозга - BDNF на органотипические культуры сетчатки. // Сборник тезисов докладов Юбилейной научно-практической конференции: Федоровские чтения-2007. Москва 2007. С.214.
11. Сергеев С.А. Использование эксплантационной органотипической культуры сетчатки для исследования воздействия ростовых факторов на различные типы клеток. // Тезисы докладов Ломоносов 2008. Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых. Москва 2008. С.20.
12. Сергеев С.А., Кошелева Н.В., Сабурин И.Н., Ревещин А.В., Семенова М.Л. Исследование поведения клеток стромы костного мозга и пигментного эпителия глаза при инъекции в органотипические культуры сетчатки. // Тезисы докладов и сообщений, представленных на школу-конференцию для молодых ученых «Методы культивирования клеток». 2008. Цитология. Т.50. №9. С. 821.
13. Сергеев С.А., Кошелева Н.В., Сабурин И.Н., Семенова М.Л. Поведение ксеногенных стволовых и прогениторных клеток в эксплантационных

- культурах. // Тезисы стендовых докладов молодых ученых. XV Школа «Актуальные проблемы биологии развития». ИБР РАН. 2008. С.90-91.
14. Сергеев С.А., Кошелева Н.В., Сабурин И.Н., Ревещин А.В., Семенова М.Л. Сравнение поведения нейральных стволовых/прогениторных клеток и клеток пигментного эпителия глаза при инъекции *in vivo* и *in vitro*. // Тезисы докладов научной школы-конференции «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования». 2009. Москва С.65.
  15. Молчанова Е.С., Семенова М.Л., Кошелева Н.В., Молчанов А.Ю., Сергеев С.А. Проникновение антисмысловых олигонуклеотидов в стромальные клетки жировой ткани мышцы. // Материалы Всероссийской научной школы-конференции для молодежи. 2009. Москва. С.42.
  16. Сергеев С.А., Горкун А.А., Кошелева Н.В., Сабурин И.Н., Семенова М.Л. Исследование поведения стромальных клеток костного мозга в составе 3D культур нейросетчатки. // Пятый международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии». 2009. Судак. С.200-201.
  17. Сергеев С.А. Применение 3D культур нейросетчатки в висячих каплях и роллерной установке для исследования поведения стволовых клеток после трансплантации. // Тезисы докладов Ломоносов 2009. Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых. Москва 2009. С.50.
  18. Тахчиди Х.П., Гаврилова Н.А., Комова О.Ю., Сабурин И.Н., Сергеев С.А., Павлова Г.В., Рыбалкина Е.Ю., Ревещин А.В. Влияние различных типов человеческих прогениторных клеток на функциональное состояние сетчатки и степень выраженности дегенеративных изменений сетчатки у крыс линии Кэмпбелл. // Сборник материалов Всероссийской конференции с элементами научной школы для молодежи: Клеточные исследования и технологии в современной биомедицине. Тула. 2009. С. 8–9.
  19. Сергеев С.А., Храмова Ю.В., Кошелева Н.В., Сабурин И.Н., Семенова М.Л. Оптимизация результатов трансплантации клеток в сетчатку, поврежденную лазерным излучением на модели эксплантационной культуры. // III Международный симпозиум "Актуальные вопросы клеточных технологий". Москва. 2010. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия Т.V. №3. С.184-186.

20. Сергеев С.А., Храмова Ю.В., Кошелева Н.В., Сабурина И.Н., Семенова М.Л. Поведение трансплантированных стволовых клеток в составе органотипической эксплантационной культуры сетчатки глаза. // Всероссийская научная школа-конференция «Стволовые клетки и регенеративная медицина». Москва. 2010. С.69.
21. Сергеев С.А., Кошелева Н.В., Сабурина И.Н., Семенова М.Л. Исследование поведения трансплантированных НСПК в составе эксплантата сетчатки глаза, подвергнутого повреждению лазерным излучением. // Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии». Судак 2010. С.264
22. Sergeev S.A., Khramova Y.V., Kosheleva N.V1., Saburina I.N., Semenova M.L. Transplanted stem cell behavior in the explantation retina culture damaged by laser emission. // 6th International Heinrich F.C. Behr Symposium «Stem Cells and Cancer». 2010. Heidelberg, Germany. P.76.
23. Сергеев С.А., Храмова Ю.В., Ефремов Ю.М. Использование атомно-силовой микроскопии для исследования распределения трансплантированных клеток стромы костного мозга при трансплантации *in vitro*. // Тезисы докладов Ломоносов 2011. Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых. Москва. 2011. С.11.
24. Сергеев С.А., Храмова Ю.В. Органотипическая культура сетчатки как модель для оценки эффективности трансплантации стволовых клеток в поврежденную сетчатку глаза. // Материалы III Международной Студенческой Научно – практической Конференции с участием молодых ученых «Клинические и теоретические аспекты современной медицины». РУДН. Москва. 2011. С.25-26.
25. Сергеев С.А., Храмова Ю.В., Ефремов Ю.М. Исследование поведения и дифференцировки стволовых клеток при *in vitro* трансплантации в 3D культуру сетчатки. // 5-я международная конференция «Современные достижения бионаноскопии». Москва. 2011. С.47-48.
26. Sergeev S.A., Khramova Y.V., Kosheleva N.V., Saburina I.N., Semenova M.L. Ex vivo model for stem cells' transplantation. // Human Reproduction. 2011. V.26. Supl.1. P.349.

### Список сокращений:

- BDNF - brain-derived neurotrophic factor – нейротрофический фактор мозга
- EGFP – enhanced green fluorescent protein – модифицированный зеленый флуоресцентный белок
- GP-45 - G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2
- GSL-IB4 - Griffonia simplicifolia IB4 isolectin
- HD – культивирование в системе висячих капель
- ONL – наружный ядерный слой сетчатки глаза
- PEDF - pigment epithelium growth factor – фактор роста пигментного эпителия
- PI – propidium iodide – йодид пропидия
- VEGF - vascular endothelial growth factor – фактор роста эндотелия
- АСМ – атомно-силовая микроскопия
- ИП – индекс площади
- ММСК – мультипотентные клетки стромы красного костного мозга
- НСПК – нейральные стволовые/прогениторные клетки
- ПЭ – пигментный эпителий
- СКЖТ – стромальные клетки подкожной жировой клетчатки
- ФР – фактор роста
- ЭРГ – электроретинограмма