

DOI: 10.1134/S0041377118120064

МЕХАНИЗМЫ ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ГЛАЗА ВЗРОСЛОГО ЧЕЛОВЕКА IN VITRO. МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

© А. В. Кузнецова, А. М. Куринов,* Л. А. Ржанова, М. А. Александрова

Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, 119334;

* электронный адрес: alexkur@rambler.ru

Изменение морфологии и молекулярно-генетического профиля клеток ретинального пигментного эпителия (РПЭ) человека *in vitro* изучали при воздействии основного фактора роста фибробластов (оФРФ). Морфологию клеток оценивали по площади и периметру клетки, коэффициентам распластывания и поляризации. Показано, что через 48 ч после добавления фактора в культуре увеличивалось число клеток вытянутой (фибробластоподобной) формы и число клеток, размер которых был меньше, чем в контроле. Одновременно снижалась пролиферативная активность клеток (по МТТ-тесту). Иммуноцитохимический анализ показал снижение окрашивания на коннексин Сх43 и усиление интенсивности окрашивания на белок нейроэпителия Оtx2. Одновременно увеличивалось количество нестин-позитивных клеток и βIII-тубулин-позитивных клеток. Методом количественной ПЦР в реальном времени в клетках РПЭ, обработанных оФРФ, выявлено увеличение экспрессии мРНК генов *KLF4*, *OCT4*, *NANOG*, *OTX2* и *NES* при одновременном понижении уровней мРНК генов *MITF* и *KRT18*, что свидетельствует об усилении дедифференцировки. Эти данные подтверждаются снижением уровня экспрессии мРНК *COL1A1*, указывающего на понижение синтетической активности клеток. Результаты свидетельствуют о том, что однократное (кратковременное) воздействие оФРФ является достаточным для активации механизма, понижающего уровень дифференцировки клеток в сторону нейроэпителия.

Ключевые слова: ретинальный пигментный эпителий, основной фактор роста фибробластов, площадь клетки, коэффициент распластывания, коэффициент поляризации, маркеры плюрипотентности

Принятые сокращения: ИЦХ — иммуноцитохимия, ИПСК — индуцированные плюрипотентные клетки, кПЦР — количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени, оФРФ — основной фактор роста фибробластов, РПЭ — ретинальный пигментный эпителий.

Ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) представляет собой однорядный слой клеток, располагающихся между нейрональной сетчаткой и сосудистой оболочкой глаза. Он обеспечивает жизнедеятельность фоторецепторов, гомеостаз нейронов сетчатки, ионный баланс, формирование гематоретинального барьера и в целом — функцию зрения. Повреждение клеток РПЭ приводит к развитию многих дегенеративно-дистрофических и пролиферативных заболеваний сетчатки глаза человека. Клетки РПЭ, в норме высокоспециализированные и непролиферирующие, под влиянием патологических индукторов могут либо погибать от апоптоза, либо репрограммироваться и изменять свое поведение. В них активируются процессы де- и трансдифференцировки (репрограммирования), в основе которых лежат нарушение межклеточных контактов, потеря пигментации, возобновление клеточного цикла и пролиферации, миграция клеток и экспрессия несвойственных для РПЭ белков, что приводит к изменению клеточного фенотипа (Fuhrmann et al., 2014). Эти клетки мигрируют, повреждают сетчатку и другие структуры глаза, что вызывает нарушение зре-

ния и слепоту (Huang et al., 2012; Zhu et al., 2013; Chiba, 2014; Fuhrmann et al., 2014; Islam et al., 2014).

В настоящее время установлено: клетки РПЭ различаются по своим свойствам (Burke, Hjelmeland, 2005; Al-Hussaini et al., 2008), что четко выявляется при их культивировании (Милюшина и др., 2011; Кузнецова, Александрова, 2016). Так, клетки РПЭ человека *in vitro* проявляют различное поведение, особенности в де- и трансдифференцировке, а часть из них обнаруживает свойства стволовых клеток (Милюшина и др., 2011, 2012; Salero et al., 2012). По характеристике (Salero et al., 2012) эти стволовые клетки не являются ни плюрипотентными, ни нейральными стволовыми клетками, несмотря на экспрессию их маркеров, а представляют собой «особенный тип стволовых клеток РПЭ», способных в определенных условиях входить в клеточный цикл и генерировать нейрональные или мезенхимные клетки. Высказана идея о том, что расположение РПЭ в сетчатке и его биологическая пластичность дают предпосылки использовать его как источник новых нейронов (Wang et al., 2010; Ezati et al., 2018). Многие авторы разрабатывают

подходы для регуляции РПЭ экзогенными морфогенами и сигнальными молекулами, способными модулировать мезенхимную (Chen et al., 2014; Zhu et al., 2014) или активировать нейрональную дифференцировку клеток (Kuznetsova et al., 2014). Поиск средств регулирования дифференцировки клеток РПЭ при патологии представляет фундаментальный и практический интерес (Liu et al., 2013; Zhu et al., 2013; Kuznetsova et al., 2014; Xiao et al., 2014).

Важным активатором нейрональной дифференцировки является сигнальный путь основного фактора роста фибробластов (оФРФ). Он играет одну из ведущих ролей в развитии нейронов в мозге и сетчатке глаза (в онтогенезе и при ее регенерации), участвует в дифференцировке нейронов из эмбриональных стволовых и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), а также способствует сохранению нейральных стволовых клеток в культуре (Schwegler et al., 1997; Lotz et al., 2013; Luz-Madrigal et al., 2014; Woodbury, Ikezu, 2014; Ferguson et al., 2015). Ранее нами показано, что клетки постоянной линии пигментного эпителия ARPE-19 под влиянием экзогенного оФРФ приобретают ряд пронеуральных свойств, несмотря на одновременное сохранение эпителиального черт (Шафеи и др., 2017). Однако иммортализованные клеточные линии РПЭ имеют значимые отличия от линий с ограниченным сроком жизни по поведению и молекулярно-генетическим свойствам клеток (Tian et al., 2005; Baldwin et al., 2014).

В связи со сказанным выше целью настоящей работы был качественный и количественный анализ морфологических и молекулярно-генетических изменений клеток РПЭ взрослого человека под влиянием оФРФ.

Материал и методика

Культура клеток. Аутопсийный материал представлен банком Московского НИИ глазных болезней им. Гельмгольца. Из глазного яблока 50-летней женщины в лаборатории получена первичная культура РПЭ по ранее описанной методике (Кузнецова и др., 2011). Первичную и пассированную культуры РПЭ вели на ростовой среде, состоящей из культуральной среды DMEM/F12 (1 : 1), L-глутамин (2 мМ; Sigma-Aldrich, США), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Pan Biotech, Германия) и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), при 37 °С и 5 % CO₂. Снятие клеток с подложки при пассировании проводили смесью растворов трипсина (0,25 %) и версена (0,48 мМ; Gibco, Invitrogen, США) в соотношении 1 : 3 (v/v). Для экспериментов использовали клетки РПЭ 4-го пассажа, которые высаживали на поверхность культурального пластика (Greiner Bio-One GmbH, Германия) в концентрации $1 \cdot 10^4$ кл./см². Для оценки действия оФРФ его добавляли в количестве 20 нг/мл в ростовую среду того же состава, но с содержанием сыворотки 1 %. Контролем служили клетки, культивируемые без оФРФ. В течение всего срока культивирования среду не меняли.

Морфометрический анализ. Для оценки морфологических изменений клетки РПЭ высаживали в культуральные флаконы для адгезивных культур T-25 Greiner CELLSTAR® (Greiner Bio-One GmbH, Германия). После культивирования в течение 24, 48, 72, 96 и 120 ч в присутствии оФРФ или без него (контроль) клетки фотографировали с помощью микроскопа Olympus (Япония) с

цифровой камерой DP70 (Olympus, Япония), затем из клеток выделяли тотальную РНК (см. ниже). Оценку морфологии клеток РПЭ проводили по изображениям случайных полей зрения (формат JPEG, размер изображения 1360 × 1024 пикселя). В программе ImageJ1.48 (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, США) на изображениях вручную с помощью мыши обводили каждую клетку, исключая те, края которых соприкасались с границами изображения. Для каждого срока проанализировали от 200 до 300 клеток, используя 3—5 микрофотографий независимых полей зрения, полученных при увеличении объектива микроскопа 10×. Программа автоматически рассчитывала площадь (Area) проекции клетки на подложке (далее площадь клетки), периметр клетки (Perimeter), большую (M) и малую (m) оси эллипса, описанного вокруг клетки (Kuz'minykh, Petrov, 2004; Петров и др., 2013). Площади и периметр клеток были рассчитаны в пикселях без перевода в метрические единицы измерения, поскольку для анализа важны не абсолютные значения, а относительные. Расчет коэффициента расплывания (отношения радиуса, вычисленного по периметру клетки, к радиусу, вычисленному по площади клетки, Rp/Ra), коэффициента поляризации (вытянутости, M/m) (Петров и др., 2013) и статистических параметров выполняли в программе Excel 2007 (Microsoft Corporation, США). Для построения спектров распределения линейных характеристик клеток (площади, периметра, коэффициентов расплывания и поляризации) их значения для каждой клетки были разделены на константу, подобранную таким образом, чтобы основная часть значений располагалась между 12—18 квартилями. Далее от полученных целых чисел считали долю клеток с соответствующей частотой встречаемости, выпадающей на соответствующий квартиль. Дополнительно в программе CellsCount3 (Россия) определяли процентное соотношение клеток вытянутой (удлиненной, фибробластоподобной) и полигональной (эпителиоподобной) форм к общему количеству клеток путем подсчета числа клеток соответствующей формы. Для этого использовали 3—5 микрофотографий независимых полей зрения при увеличении объектива 4×. Для оценки статистической значимости различий между группами использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при уровнях значимости $P < 0.01$ и $P < 0.05$.

Иммуноцитохимический (ИЦХ) анализ. Клетки высаживали на круглые покровные стекла (Cell-Star, Германия) в 24-луночные планшеты и после культивирования в отсутствие (контроль) или в присутствии оФРФ через 24, 48, 72 и 120 ч фиксировали в течение 15 мин 4%-ным параформальдегидом (Sigma-Aldrich). Дифференцировку клеток оценивали по иммунофлуоресценции, используя первичные антитела (Abcam, Великобритания) к нестину (ab22035, мышинные, 1 : 100), βIII-тубулину (ab7751, мышинные, 1 : 100) и антитела (Sigma-Aldrich, США) к коннексину 43 (Cx43; C6219, 1 : 200) и белку Otx2 (AV32439, кроличьи, 1 : 100), разведенные в 0,1%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA; Sigma-Aldrich, США).

Препараты экспериментальной и контрольной групп клеток РПЭ обрабатывали параллельно для последующего проведения сравнительного анализа. ИЦХ-анализ препаратов включал в себя блокировку неспецифического связывания 1%-ным BSA в течение 20 мин, инкубацию с первичными антителами при 4 °С в течение ночи, связывание первичных антител с соответствующими вторич-

Праймеры для количественной ПЦР в реальном времени

Ген (номер по базе данных)	Последовательность праймеров прямого (F) и обратного (R); зонд	Размер ампликона, п. н.
<i>GAPDH</i> (NM_001289746)	F: 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' R: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3' Зонд: 5'-FAM-CCATCAATGACCCCTTCATTGACC-BHQ1-3'	220
<i>OCT4</i> (NM_002701)	F: 5'-GAACCGAGTGAGAGGCAACC-3' R: 5'-ATAGTCGCTGCTTGATCGCTT-3' Зонд: 5'-FAM-CAGTGCCCCGAAACCCACACTGC-BHQ1-3'	163
<i>NANOg</i> (NM_024865)	F: 5'-GAAATACCTCAGCCTCCAGCA-3' R: 5'-TGCCACCTCTTAGATTTTCATTCTC-3' Зонд: 5'-FAM-CTCTCCAACATCCTGAACCTCAGCTACA-BHQ1-3'	111
<i>KLF4</i> (NM_001314052.1)	F: 5'-ACCAGGCACTACCGTAAACACA-3' R: 5'-GGTCCGACCTGGAAAATGCT-3' Краситель: EveGreen	79
<i>OTX2</i> (NM_001270525; NM_021728)	F: 5'-ATGGACTTGCTGCACCCCT-3' R: 5'-CAAACAGTGCTTCCAGCACATC-3' Зонд: 5'-VIC-GGGTACCCGGCCACCC-3'	109
<i>PAX6</i> (NM_001604)	F: 5'-CAATTCCACAACCCACCACAC-3' R: 5'-CTGTAGGTGTTTGTGAGGGCTGT-3' Зонд: 5'-FAM-TCCTCCTCACATCTGGCTCCATGT-BHQ1	88
<i>MITF</i> (NM_198159)	F: 5'-CACCAGCCATAAACGTCAGTGT-3' R: 5'-CGAGGTGGGTCTGCACCTT-3' Зонд: 5'-FAM-CCACCACCCTTCCCTCTGCCAC-BHQ1	87
<i>KRT18</i> (NM_199187.1; NM_000224.2)	F: 5'-GAGGACCTGAGGGGCTCAGA-3' R: 5'-GACTCTAAAGTCATCAGCAGCAA-3' Зонд: 5'-FAM-ACTGTGGACAATGCCCGCATC-BHQ1-3'	98
<i>TUBB3</i> (NM_006086)	F: 5'-GGGCCAAGTTCTGGGAAGTC-3' R: 5'-CGAGTCGCCCCACGTAGTTG-3' Зонд: 5'-FAM-ATGAGCATGGCATCGACCCAGC-BHQ1-3'	71
<i>NESTIN</i> (NM_006616.1)	Hs04187831_g1 (Applied Biosystems, США)	58
<i>COL1A1</i> (NM_000088.3)	F: 5'-GTCGAGGGCCAAGACGA-3' R: 5'-CAGGTCTCGGTCATGGTAC-3' Зонд: 5'-FAM-CATCCCACCAATCACCTGCGTAC-BHQ1-3'	71

ными антителами, меченными флуорохромами Alexa Fluor® 488 или 594 (Molecular Probes, США), в течение 40 мин при комнатной температуре, заключение в среду с ядерным красителем DAPI (Vectashield®, Vector Laboratories, США). Оценку результатов ИЦХ-анализа и фотографирование проводили с помощью микроскопа Olympus (Япония) с цифровой камерой DP70. Для подсчета антиген-позитивных клеток на фотографиях (при увеличении объектива 20×) использовали программу ImageJ1.48.

Оценка пролиферативной активности клеток (МТТ-тест). Клетки высаживали в 96-луночные планшеты и культивировали в течение 24, 48 и 72 ч в отсутствие (контроль) и в присутствии оФРФ. Для оценки пролиферативной активности клеток за 3 ч до окончания срока культивирования в каждую лунку добавляли маточный раствор (5 мг/мл) метилтиазолилдифенил-тетразолиум бромид (МТТ; Sigma-Aldrich, США; синоним: 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид) в соотношении 1 : 10 по отношению к объему ростовой среды. По окончании инкубации удаляли ростовую среду, затем для извлечения из клеток образовавшегося темноокрашенного формазана добавляли 100 мкл ДМСО (Applichem, Германия) и ресуспендировали оса-

док. Анализ оптической плотности окрашенного раствора проводили на планшетном анализаторе StatFax 2100 (Awareness Technology INC, США) при 545 нм и корректирующем фильтре 630 нм. Для вычисления средних значений оптической плотности окрашенных растворов (8 повторностей на каждую временную точку) и стандартных отклонений применяли программное обеспечение Excel 2007 (Microsoft Corporation, США). Пролиферативную активность клеток (%) оценивали по изменению средних значений оптической плотности растворов по отношению к контролю, принятому за 100 %. Для оценки статистической значимости различий между группами использовали *t*-критерий Стьюдента. Влияние оФРФ на пролиферативную активность клеток считали выявленным при уровне значимости $P < 0.01$.

Количественная ПЦР в реальном времени (кПЦР). Выделение тотальной РНК из культуры клеток проводили с TRI® Reagent (Sigma-Aldrich) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Для этого лизирующий раствор заливали во флаконы T25 через 24, 48, 72 и 120 ч после посадки клеток РПЭ в среду с оФРФ или без него (контроль) и их фотографирования для морфометрического анализа. Для референтного контроля использовали линию клеток KYOU-DXR0109B Human In-

duced Pluripotent Stem Cells (ИПСК) [201B7] (ATCC® ACS-1023™) 14—16-го пассажей, полученную из дермальных фибробластов человека (линия любезно предоставлена Э. Б. Дашинимаевым; Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН), и неиммортизованную клеточную линию дермальных фибробластов 15-го пассажа, полученную из кожи женщины 52 лет (предоставлена О. С. Роговой; Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН). Синтез кДНК проводили с помощью набора RevertAid H Minus Kit (Fermentas, Литва) в объеме 20 мкл, используя 1 мкг тотальной РНК, обработанной ДНКазой.

С помощью кПЦР оценивали изменения уровня экспрессии мРНК следующих генов, кодирующих транскрипционные факторы, сигнальные белки и маркеры дифференцировки: *OCT4*, *NANOG*, *OTX2*, *PAX6*, *MITF*, *KRT18*, *COL1A1*, *βIII-тубулин (TUBB3)* (праймеры и зонды от ДНК-Синтез, Россия), *KLF4* (праймеры предоставлены Э. Б. Дашинимаевым, Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН) и *NES* (Applied Biosystems, США). В качестве эндогенного контроля использовали глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (*GAPDH*) (праймеры и зонд от ДНК-Синтез, Россия). Смесь реагентов для кПЦР (25 мкл) включала в себя 2 мМ MgCl₂, 200 мкМ dNTPs, 1 ед. Maxima HS Taq-полимераза (Fermentas, Латвия), 5 мкл разведенной кДНК (эквивалентной 4 нг исходной тотальной РНК), 250 нМ праймеров и 250 нМ зонда (см. таблицу). кПЦР проводили на приборе ABI Prism 7500 PCR system (Applied Biosystems, США). Программа для ПЦР включала в себя 1 цикл денатурации при 95 °С 3 мин, 40 циклов денатурации при 95 °С 15 с и совмещенный этап отжига—синтеза при 60 °С 1 мин. Пороговый цикл определяли, применяя программное обеспечение 7500 Software v2.0.1 (Applied Biosystems, США). Экспрессию каждой мРНК определяли постановкой ПЦР в двух повторах. Обработка данных qPCR включала в себя усреднение значений Ct для повторных точек в эксперименте и расчет значений относительной экспрессии исследуемых генов методом $\Delta\Delta Ct$ для каждого образца с использованием значения Ct по гену *GAPDH* в качестве нормирующего. Результаты представлены как средние значения и их ошибка. Для оценки статистической значимости различий между группами использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0.01$.

Результаты и обсуждение

Морфология клеток РПЭ в первичной культуре и при субкультивировании имела сходство с клетками в культурах, полученных нами от других доноров и описанных ранее (Милюшина и др., 2011; Kuznetsova et al., 2016). Культуры клеток РПЭ 4-го пассажа состояли из непигментированных и слабопигментированных полигональной формы эпителиоподобных и вытянутой формы фибробластоподобных клеток, что свидетельствует об их дедифференцировке *in vitro*. После однократного воздействия оФРФ в клетках выявлялись морфологические отличия от контрольных клеток. Под фазово-контрастным микроскопом они имеют место во всех временных точках. Значительную выраженность изменений культуры отмечали через 48 ч после добавления фактора, которая и заключалась в увеличении числа клеток вытянутой (фибробластоподобной) формы (рис. 1).

Данные, полученные на светооптическом уровне (рис. 2, а), подтверждаются результатами количественного анализа, проведенного по микрофотографиям в программе CellsCount3. Так, в группе клеток РПЭ, обработанных оФРФ, число клеток вытянутой формы увеличивается через 24 ч с максимумом значения через 48 ч после добавления фактора (рис. 2, б). Сходные морфологические изменения в культуре клеток РПЭ под влиянием оФРФ были получены в исследованиях на глазе цыпленка *in vivo* (Luz-Madrigal et al., 2014) и на РПЭ человека *in vitro* (Милюшина и др., 2011).

Результаты количественного анализа представлены на рис. 3. Они показывают изменения морфологических параметров клеток после воздействия оФРФ с течением времени по сравнению с контролем. На всех сроках наблюдения средние значения площади клеток в эксперименте ниже, чем в контроле (рис. 3, а), и их различия постепенно увеличиваются с течением времени: на 14 (24 ч), 20 (48 ч), 27 (72 ч), 31 (96 ч) и 37 (120 ч) %. Уменьшение площади клеток свидетельствует об изменении их размера или появлении субпопуляций новых клеток меньшего размера под влиянием оФРФ. В этой же группе наблюдали снижение средних значений периметра клеток через 96 и 120 ч (рис. 3, б). Однако средние значения коэффициентов поляризации (вытянутости) и расплывания были выше в промежутке 48—96 ч (рис. 3, в, г). Увеличение коэффициента поляризации подтверждает

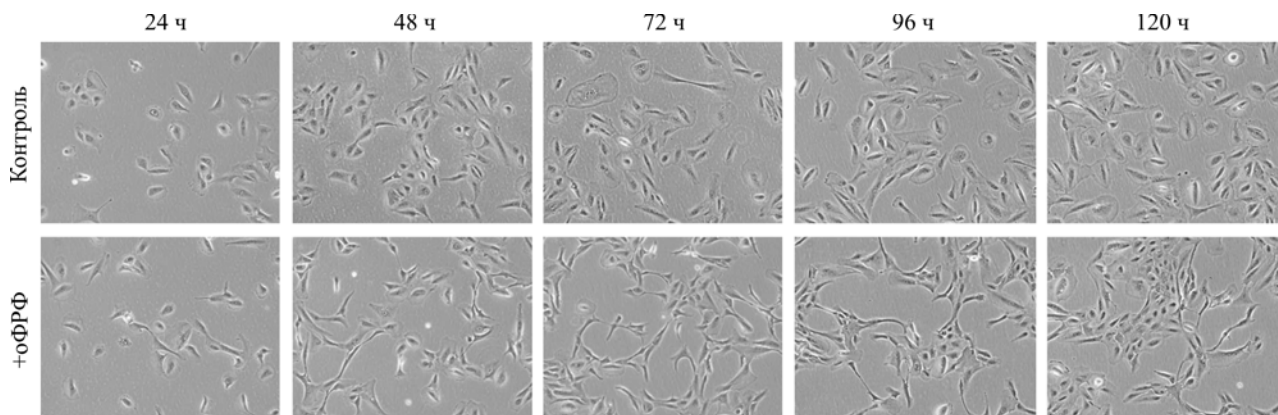


Рис. 1. Культура клеток ретинального пигментного эпителия глаза взрослого человека в отсутствие (контроль) и в присутствии 20 нг/мл оФРФ. В течение всего срока культивирования среду не меняли.

Фазовый контраст. Об. 10×.

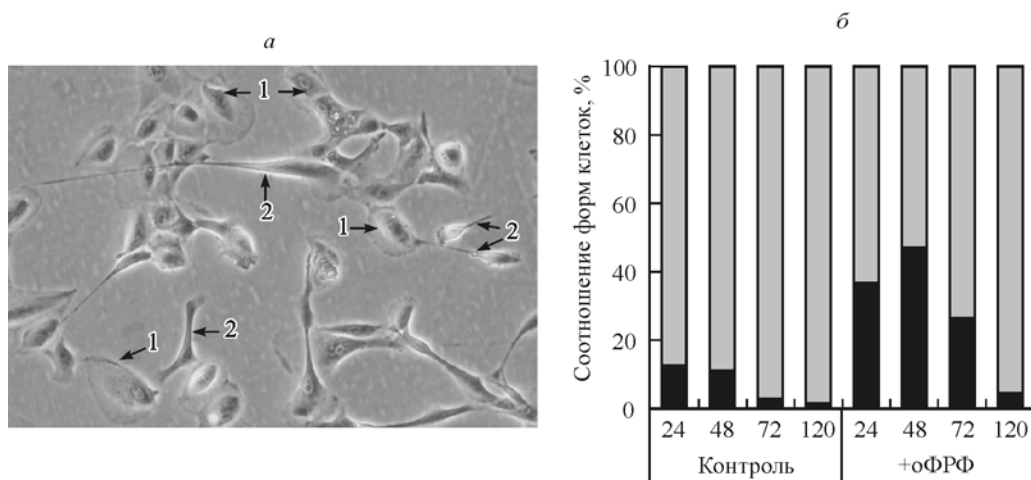


Рис. 2. Морфологические формы клеток (а) и процентное соотношение долей клеток разной формы (б) в культуре ретинального пигментного эпителия (РПЭ) после добавления оФРФ.

а — морфология клеток полигональной (1) и вытянутой (2) формы, фрагмент изображения культуры клеток в присутствии оФРФ, фазовый контраст, об. 10×; б — процентное соотношение клеток вытянутой (черный цвет) и полигональной (серый цвет) форм в контроле и в присутствии оФРФ; под столбцами указано время, ч.

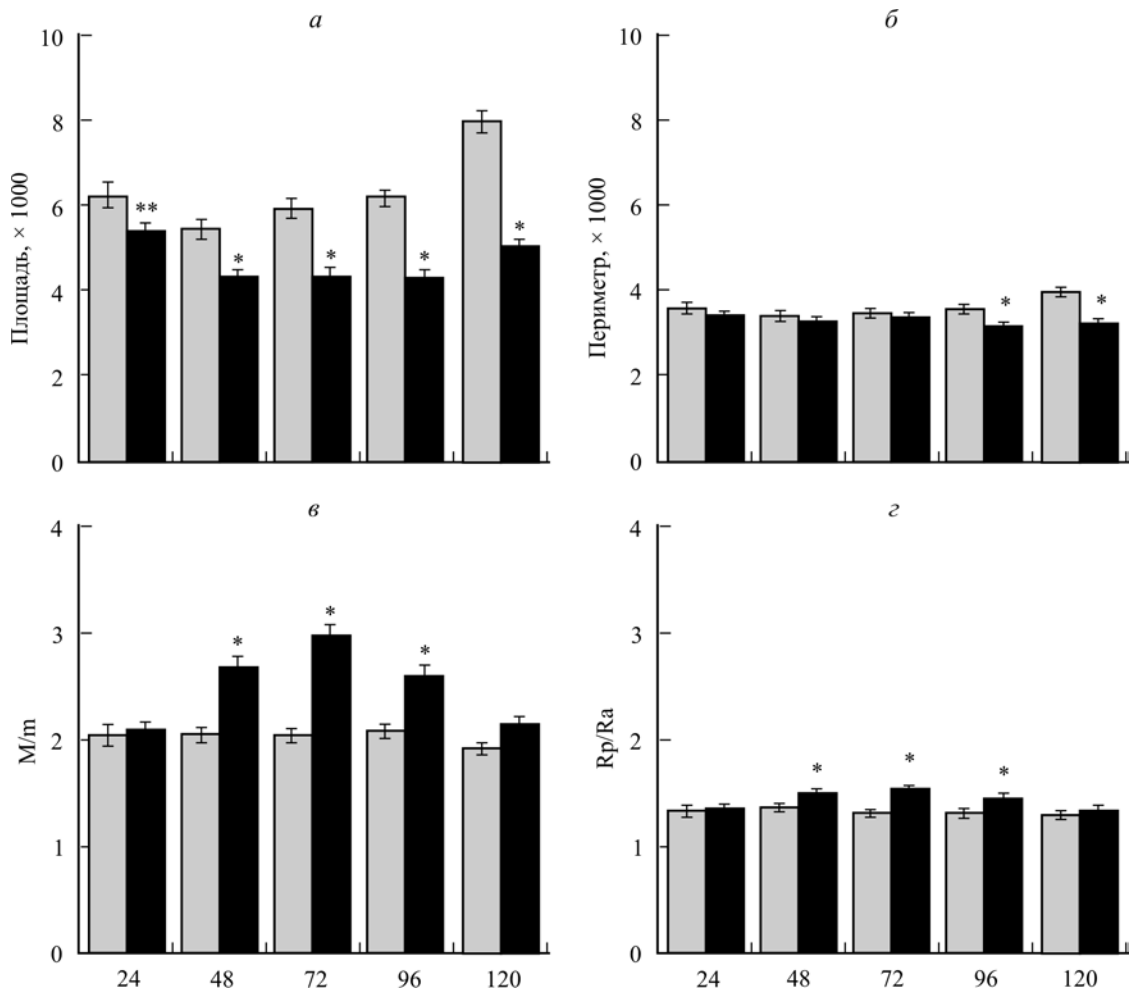


Рис. 3. Морфометрические параметры клеток РПЭ в отсутствие (контроль, серые столбики) и в присутствии 20 нг/мл оФРФ (черные столбики) в разные временные промежутки после введения в среду оФРФ.

По горизонтали — время, ч. Площадь (а) и периметр (б) клеток указаны в пикселях, М/м — коэффициент поляризации (в), Rp/Ra — коэффициент распластывания (г). Представлены средние значения и их ошибки (вертикальные отрезки). Отличия от контроля достоверны при *P < 0.01 или **P < 0.05.

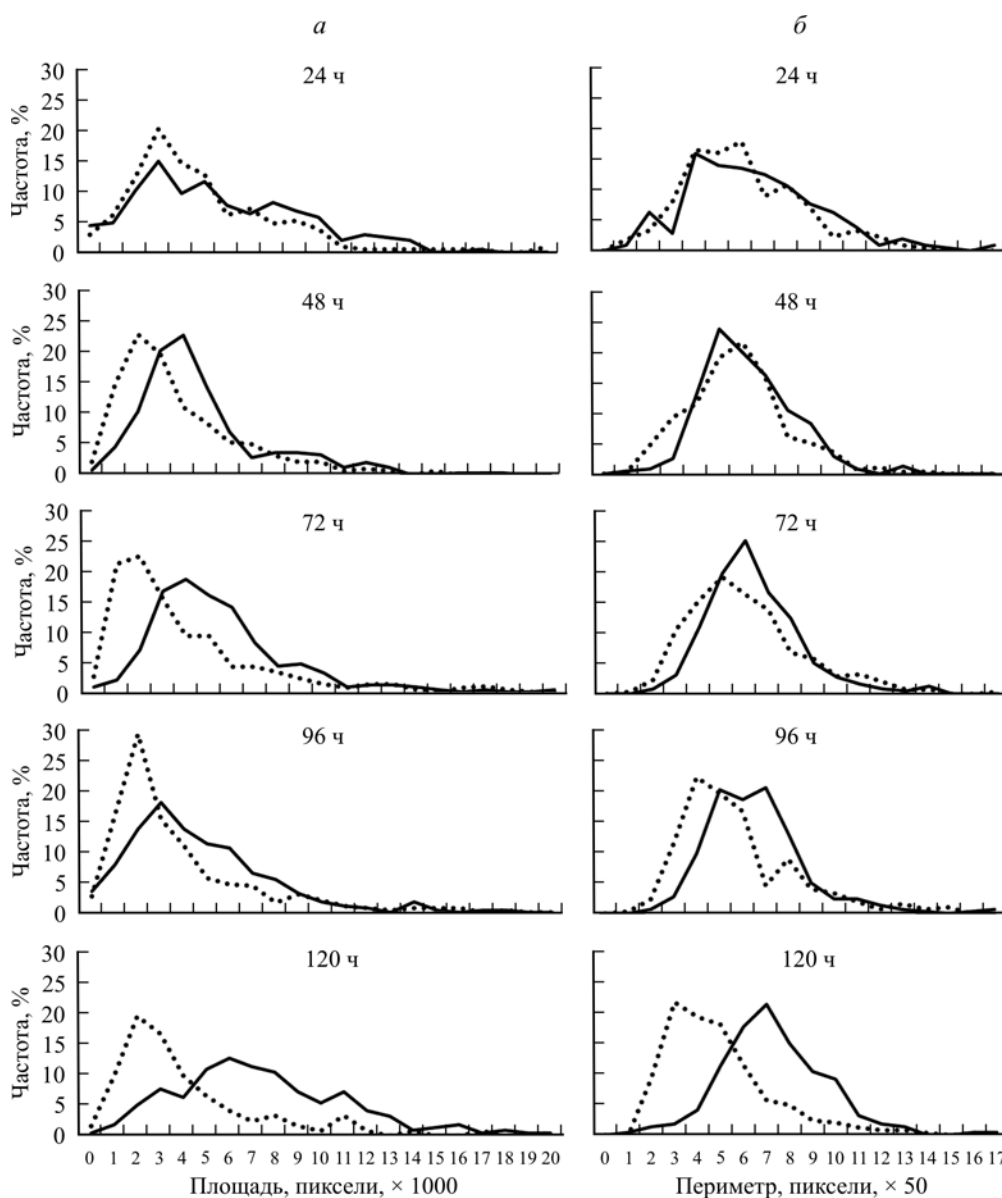


Рис. 4. Гистограммы частот распределения клеток РПЭ по величинам площади (а), периметра (б), коэффициенту поляризации (M/m, в) и коэффициенту расплывания (Rp/Ra, г) в контроле (сплошные линии) и в присутствии 20 нг/мл оФРФ (пунктирные линии) в разные временные промежутки после его введения в среду.

данные, полученные на светооптическом уровне, и говорит в пользу увеличения числа клеток вытянутой формы.

На рис. 4 представлены данные, демонстрирующие частоты распределения клеток с различными значениями площади (а), периметра (б), коэффициента поляризации (в) и расплывания (г) при культивировании после воздействия оФРФ с течением времени по сравнению с контролем. Несмотря на куполообразный вид, характерный для нормального распределения, можно идентифицировать асимметричные в той или иной степени формы кривой с пиками, соответствующими отдельным более однородным группам клеток или субпопуляциям (Петров и др., 2013). Через 48 ч после воздействия оФРФ отмечается расхождение пиков распределения значений площади и периметра клеток по сравнению с контролем, которые постепенно смещаются в сторону меньших значений и достигают максимально выраженных различий к 120 ч культивирования. Полученные данные свидетельствуют

о появлении клеток РПЭ меньшего размера. Через 48 ч после воздействия оФРФ наблюдается размывание основных пиков вычисляемых параметров M/m и Rp/Ra в сторону больших значений, что свидетельствует об увеличении количества вытянутых клеток и появлении клеток с отростками. Максимум эффекта оФРФ наблюдается через 72 ч после его добавления, который спадает к 120 ч.

Результаты количественного анализа, проведенного впервые, наглядно продемонстрировали гетерогенность клеток РПЭ человека по морфологическим параметрам, что дополняет микроскопические наблюдения, представленные в ранее опубликованных работах (Burke, Hjelmeland, 2005; Al-Hussaini et al., 2008). Тот факт, что клетки уменьшаются в размере, может указывать на дедифференцировку клеток РПЭ в сторону нейроэпителия под влиянием оФРФ, что описано в ряде работ (Luz-Madrigal et al., 2014; Zhu et al., 2014). Кроме того, кратковременное (до 72 ч) появление клеток с вытянутыми отростками по-

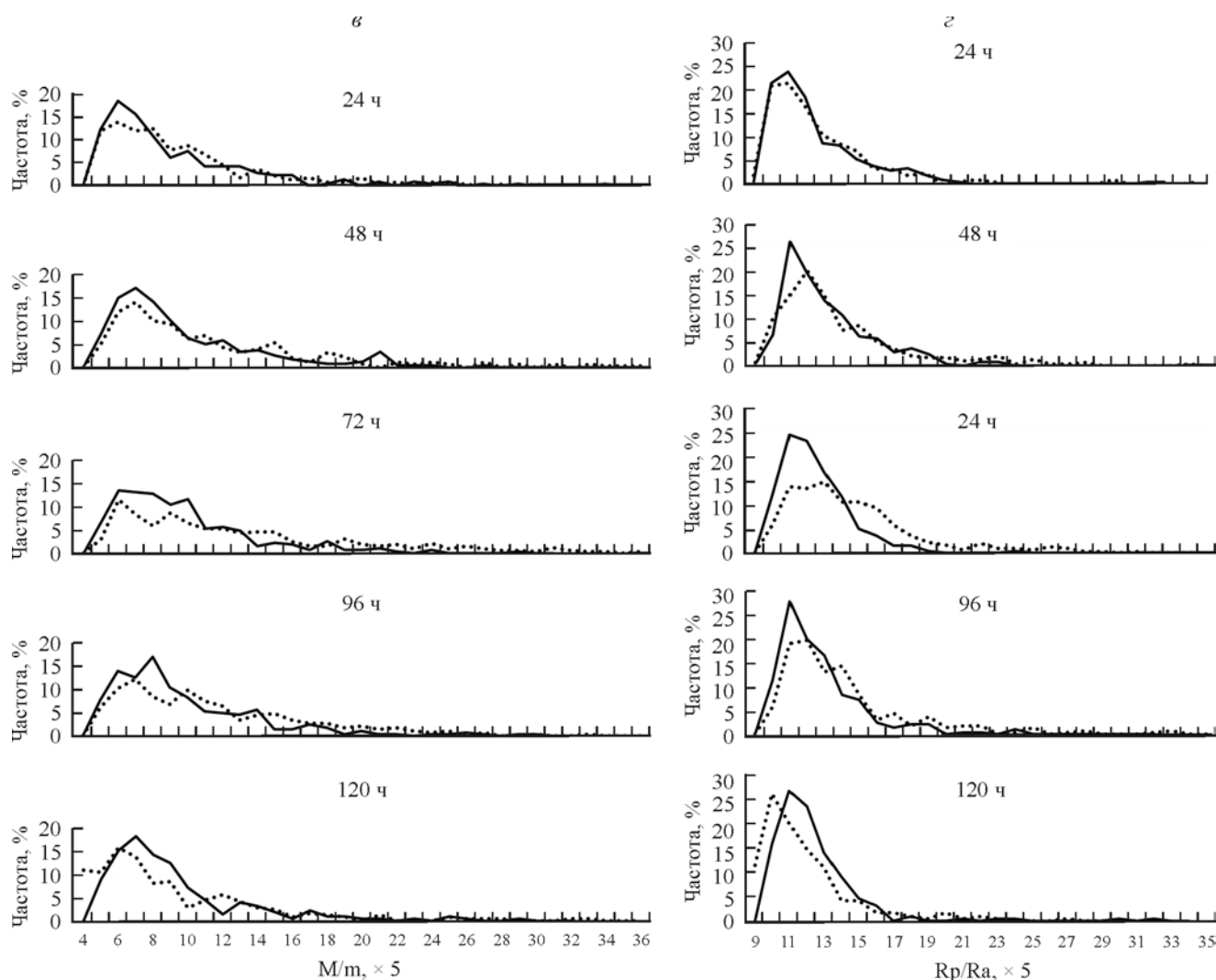


Рис. 4 (продолжение).

звояет предполагать, что по крайней мере часть популяции клеток способна проявлять пронеуральные свойства даже при однократном воздействии фактора. Полученный результат выявил первичный этап воздействия оФРФ, что представляет интерес, поскольку известно, что активация трансдифференцировки клеток РПЭ и конверсия их в нейроны у разных видов позвоночных *in vivo* и *in vitro* требуют поддержания высокого уровня оФРФ продолжительное время (Pittack et al., 1991; Sakaguchi et al., 1997; Spence et al., 2007; Luz-Madrigal et al., 2014).

Наблюдение за клетками РПЭ на светооптическом уровне показало увеличение их числа от момента посадки с течением времени культивирования (рис. 1), что подтвердил количественный анализ на микрофотографиях в программе CellCount3 (рис. 5, а). Хотя пролиферация является естественным процессом, для клеток РПЭ *in vitro* оказалось, что число клеток после воздействия оФРФ было статистически ниже, чем в контроле, на сроке 48 ч. Данные количественного анализа указывают на снижение пролиферации и совпадают с результатами МТТ-теста на сроке 48 ч (рис. 5, б). оФРФ при добавлении в среду культивирования понижал пролиферативную активность клеток РПЭ взрослого человека с 24 до 48 ч, что может

свидетельствовать об изменении дифференцировочного статуса. Из данных литературы (Zhao et al., 1995) известно, что у эмбрионов крыс конверсия клеток РПЭ в нейроны на ранних этапах не сопряжена с пролиферацией, и считается, что оФРФ может напрямую (без деления клеток) изменять транскрипцию в клетках РПЭ. Похожие результаты получены на бесхвостых амфибиях. Например, у тритонов начальные стадии трансдифференцировки РПЭ в сетчатку не сопровождаются пролиферацией клеток, хотя в дальнейшем она очень высокая (Григорян и др., 2013).

Чтобы понять основные механизмы морфологических изменений в клетках РПЭ, наблюдаемых после культивирования с оФРФ, провели ИЦХ-анализ и кПЦР. ИЦХ-анализ показал, что во всех клетках РПЭ — как контрольных, так и экспериментальных — детектировался маркер РПЭ и нейроэпителия белок Otx2, он локализовался в ядре и имел различную интенсивность флуоресцентного сигнала — от слабой до сильной. Под действием оФРФ через 24 (данные не показаны), 48 (рис. 6) и 72 ч интенсивность окрашивания была выше, через 120 ч — ниже, чем в контроле (данные не показаны).

Известно, что в процессе развития нервной системы Otx2 активно экспрессируется в нейроэпителии передне-

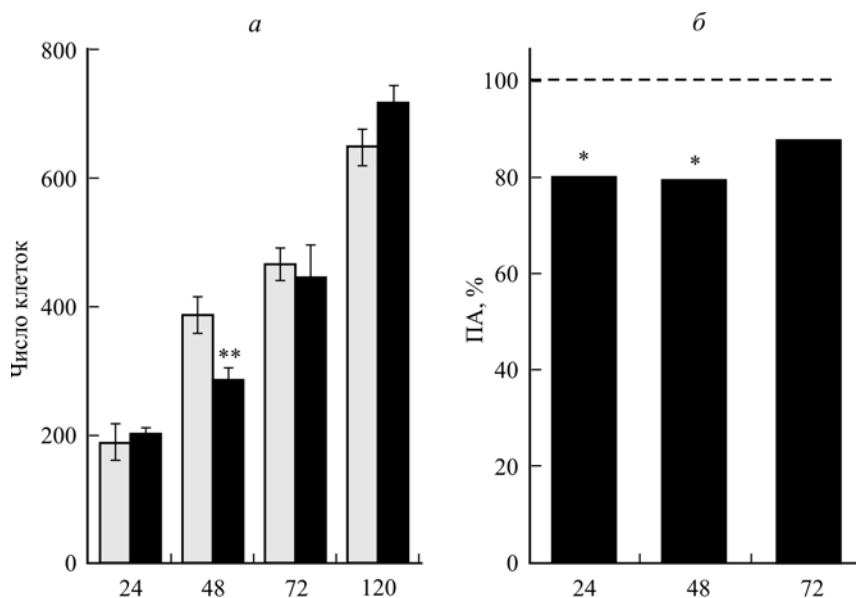


Рис. 5. Число клеток РПЭ (а) в контроле (светлые столбики) и через разные промежутки времени после добавления оФРФ (черные столбики), а также пролиферативная активность клеток (ПА, б).

По горизонтали — время, ч. Клетки считали в программе CellsCount3 на микрофотографиях независимых полей при об. 4×. б — ПА-активность клеток (МТТ-тест) после введения в среду оФРФ, % от контроля, принятого за 100% (штриховая линия). Отличия от контроля достоверны при * $P < 0.01$ и ** $P < 0.05$.

го мозга и соответственно во всем оптическом пузырьке (Martinez-Morales et al., 2003; Westenskow et al., 2010). Otx2 совместно с транскрипционным фактором Mitf направляет дифференцировку клеток нейроэпителия в РПЭ (Martinez-Morales et al., 2001, 2003). Оба транскрипционных фактора необходимы для развития пигментных клеток сетчатки, и они поддерживаются на высоком уровне в зрелом РПЭ. Помимо этого, Otx2 участвует в дифферен-

цировке фоторецепторов и биполярных нейронов (Koike et al., 2007) и сохраняется в дефинитивных клетках. Поэтому нельзя исключить, что в процессе репрограммирования РПЭ человека транскрипционный фактор Otx2 играет двойственную роль, одновременно маркируя пронейральную и эпителиальную популяции клеток.

В связи с тем что в функционировании клеток РПЭ важную роль играют межклеточные щелевые контакты

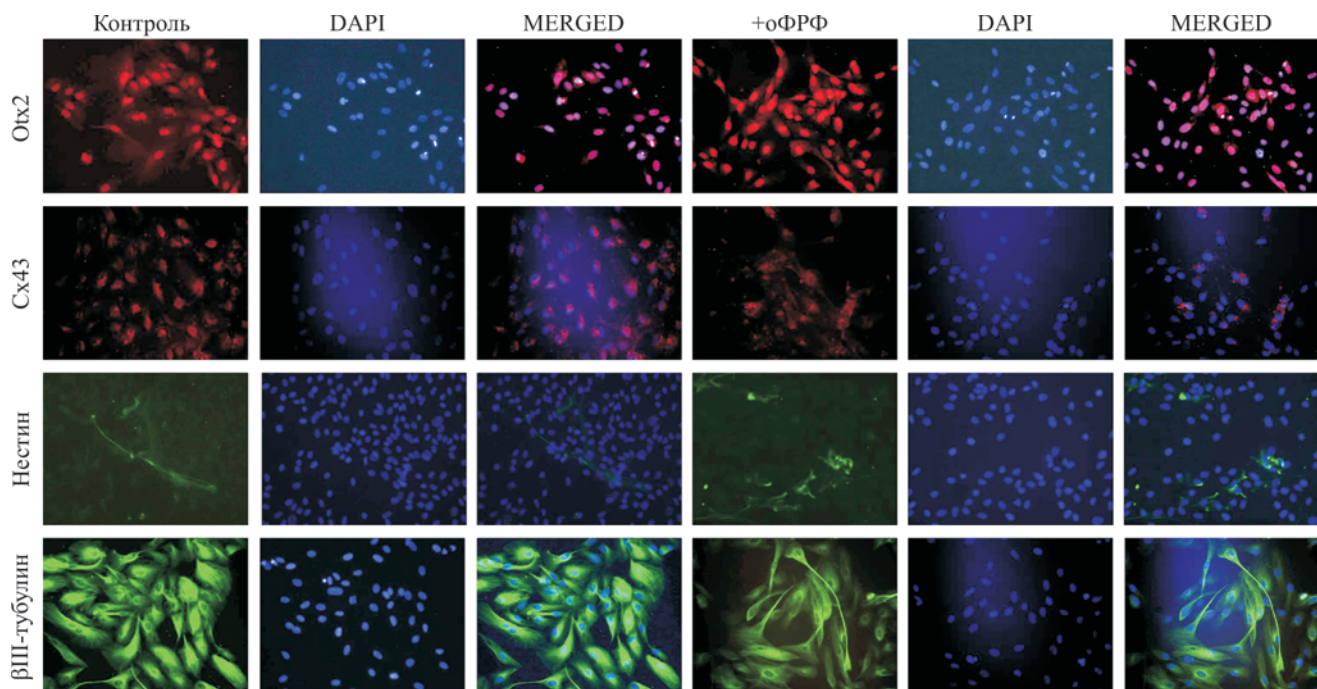


Рис. 6. Иммунофлуоресцентный анализ клеток РПЭ на маркеры Otx2, Sx43, нестин, βIII-тубулин в контроле и через 48 ч после добавления в среду 20 нг/мл оФРФ.

Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Об. 20×.

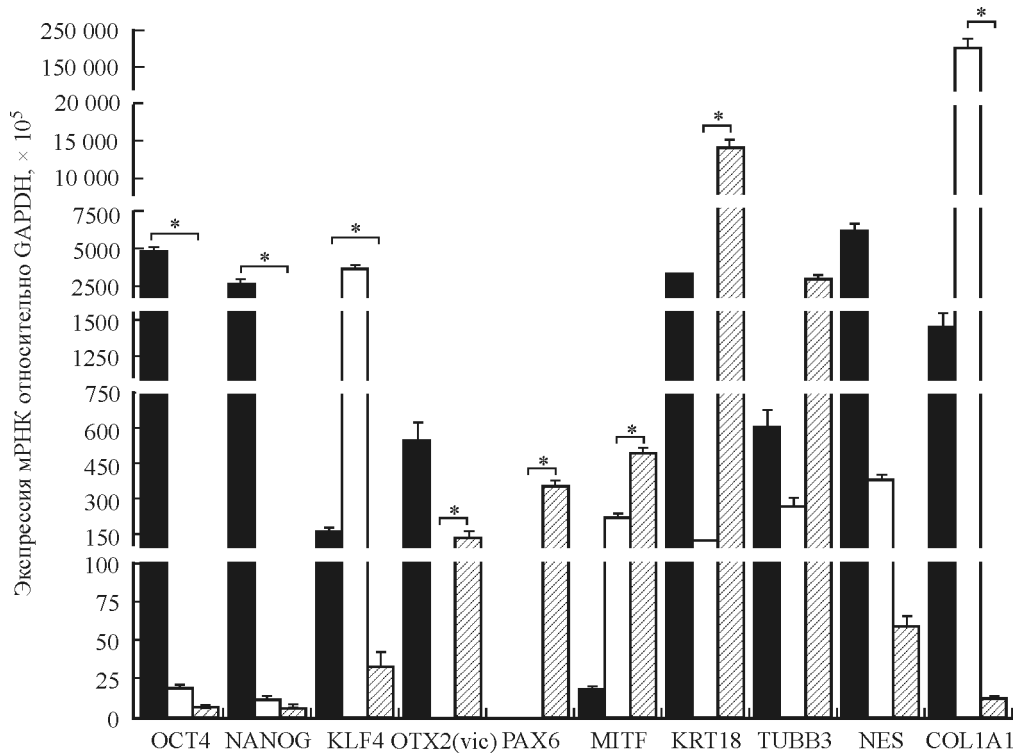


Рис. 7. Результаты кПЦР, иллюстрирующие относительную экспрессию генов *OCT4*, *NANOG*, *KLF4*, *OTX2*, *PAX6*, *MITF*, *KRT18*, *TUBB3*, *NES* и *COL1A1* в клеточных культурах ИПСК (черные столбики), дермальных фибробластов (белые столбики) и РПЭ взрослого человека (заштрихованные столбики).

В качестве гена для нормировки использован *GAPDH*. Данные представлены как средние значения из двух независимых экспериментов (каждый в двух повторах) и их стандартные отклонения. Различия экспрессии мРНК целевых генов в исследуемых образцах РПЭ по сравнению с референтными культурами считали значимыми по *t*-критерию Стьюдента при $*P < 0.05$.

(Kojima et al., 2008), мы изучили окраску белка щелевых контактов Sx43. После действия оФРФ через 24 (данные не показаны), 48 (рис. 6) и 72 ч интенсивность флуоресцентного сигнала в клетках была ниже по сравнению с контрольными клетками тех же сроков. Снижение интенсивности окрашивания Sx43 межклеточных контактов

свидетельствует о потере эпителиальных свойств клеток РПЭ *in vitro*, которая ускоряется под действием оФРФ. Относительно белка Sx43 известно, что он нехарактерен для нейронов, за исключением подтипа амакриновых клеток сетчатки (Theofilas et al., 2017). В то же время его экспрессия обнаружена в ИПСК (Beckmann et al., 2016), что

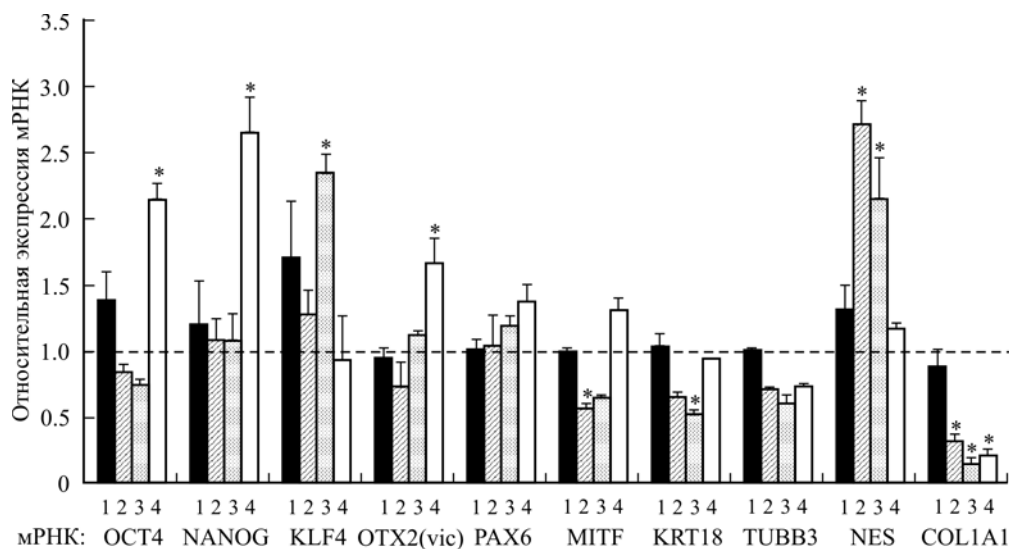


Рис. 8. Влияние оФРФ разной длительности на экспрессию мРНК маркеров дифференцировки и плюрипотентности клеток РПЭ. Столбцы: 1 — 24 ч, 2 — 48 ч, 3 — 72 ч, 4 — 120 ч. Изменение экспрессии показано относительно контрольных клеток РПЭ (в отсутствие оФРФ) на тех же сроках культивирования. Вертикальные отрезки — ошибки среднего. Различия экспрессии мРНК генов в исследуемых образцах РПЭ по сравнению с контролем считали значимыми по *t*-критерию Стьюдента при $*P < 0.05$.

указывает на наличие щелевых контактов даже в недифференцированных клетках.

Окраска клеток антителами на нестин (белок-маркер нейроэпителиальных и нейральных стволовых клеток) показала, что количество маркированных клеток увеличивается через 24 (данные не показаны) и 48 ч (рис. 6) после воздействия оФРФ и затем уменьшается через 72 и 120 ч по сравнению с контролем. Данные свидетельствуют о том, что в культуре РПЭ изначально присутствуют нестин-позитивные клетки, число которых возрастает при воздействии оФРФ. Транзиторное увеличение их числа, вероятно, не связано с делением нестин-позитивных клеток, поскольку в данный интервал времени пролиферативная активность клеток снижена по сравнению с контролем (рис. 5, б). Результаты в значительной степени дополняют данные исследований по репрограммированию РПЭ под влиянием оФРФ у разных видов позвоночных и человека (Spence et al., 2007; Luz-Madrigal et al., 2014).

ИЦХ-анализ βIII-тубулин-позитивных клеток (маркер ранней стадии дифференцировки нейронов сетчатки) выявил, что через 24 ч после воздействия оФРФ в культуре увеличивалось количество клеток с ламинарным окрашиванием на βIII-тубулин по сравнению с контролем. Однако через 48 (рис. 6), 72 и 120 ч наблюдали снижение их количества, что поддерживает вышеприведенные наблюдения о понижении дифференцировки клеток.

В целом результаты ИЦХ-анализа показывают, что однократное (кратковременное) воздействие оФРФ является достаточным для активации механизма, понижающего уровень дифференцировки клеток в сторону нейроэпителия.

Чтобы понять степень дифференцировки контрольных клеток РПЭ, мы сравнили уровни экспрессии мРНК генов, кодирующих транскрипционные факторы, сигнальные белки и маркеры дифференцировки в них, с таковыми в культурах ИПСК и дермальных фибробластов человека (рис. 7). В клетках РПЭ уровень экспрессии мРНК генов-маркеров РПЭ (*OTX2*, *PAX6*, *MITF* и *KRT18*) был выше, чем в референтной культуре, полученной из дермальных фибробластов. Уровень экспрессии мРНК генов-маркеров плюрипотентности (*OCT4*, *NANOG* и *KLF4*) в культуре РПЭ очень низкий в сравнении с ИПСК. Значение экспрессии мРНК гена-маркера белка внеклеточного матрикса (*COL1A1*) значительно ниже, чем в референтной культуре дермальных фибробластов, что указывает на то, что фибробластоподобные клетки не являются истинными фибробластами, а только имеют сходную морфологию. В целом в клетках РПЭ можно наблюдать экспрессию как генов-маркеров РПЭ, так и генов-маркеров нейральных и плюрипотентных стволовых клеток, что говорит в пользу их пластичности.

Через 48 ч после воздействия оФРФ в клетках РПЭ увеличивался уровень мРНК гена *NES* в 2.7 раза, одновременно снижались уровни мРНК генов *MITF* в 1.8 раза и *COL1A1* в 3.1 раза по сравнению с контролем (рис. 8). Через 72 ч отмечали увеличение уровня мРНК гена *KLF4* в 2.4 раза и снижение уровня мРНК гена *KRT18* в 1.9 раза. Через 120 ч происходило увеличение экспрессии мРНК генов *OCT4* в 2.1 раза, *NANOG* в 2.6 раза и *OTX2* более чем в 1.5 раза. Можно полагать, что увеличение в клетках РПЭ уровней мРНК генов-маркеров нейральных стволовых клеток (*NES*) и нейроэпителия (*OTX2*) совместно с понижением уровней мРНК генов-маркеров РПЭ (*MITF* и *KRT18*) во временном интервале 24—72 ч свидетельству-

ет о дедифференцировке клеток в сторону нейроэпителия под влиянием оФРФ. В то время как повышение экспрессии генов-маркеров плюрипотентности (*KLF4*, *OCT4* и *NANOG*) во временном интервале 72—120 ч, вероятно, свидетельствует об увеличении среди дедифференцированных клеток РПЭ нейральных стволовых клеток, которые их экспрессируют (Murrell et al., 2013; Sandberg et al., 2014; Vincent et al., 2017). Эти данные логично сопоставить с исследованиями трансдифференцировки клеток Мюллеровой глии через дедифференцировку в нейроны сетчатки, которая активно протекает у рыб, но подавлена у мышей. Авторы обнаружили транзиторное повышение экспрессии плюрипотентных генов в клетках Мюллеровой глии у мышей, происходящее в первые часы после травмы, и предположили, что дедифференцировку блокирует быстрое метилирование ДНК, подавляющее появление мультипотентных клеток (Reyes-Aguirre, Lamas, 2016). Нельзя исключить, что подобные процессы сопровождают дедифференцировку РПЭ у человека.

В заключение следует отметить, что клетки РПЭ человека *in vitro* существуют в лабильном состоянии, демонстрируя одновременно свойства стволовых клеток и клеток-предшественников, но также сохраняя особенности дифференцированного состояния. Однократное воздействие оФРФ показывает, что первоначально механизм его действия не связан с активацией пролиферации, а направлен на понижение дифференцировки РПЭ путем активации плюрипотентных генов (*OCT4*, *NANOG*, *KLF4* и *OTX2*) и генов нейральных стволовых клеток (*NES*), что сопровождается уменьшением размеров клеток. Описанные процессы не представляют собой трансдифференцировку в классическом смысле, поскольку клетки РПЭ не дифференцируются в нейроны сетчатки. Тем не менее результаты показывают, что в зрелом РПЭ под влиянием оФРФ могут активироваться механизмы дифференцировки в нейроэпителиальном направлении.

Работа выполнена в рамках раздела Госзадания ИБР РАН по теме № 0108-2018-0004 с использованием оборудования ЦКП ИБР РАН.

Список литературы

- Григорян Э. Н., Маркитантова Ю. В., Авдонин П. П., Радугина Е. А. 2013. Исследование регенерации у амфибий в эпоху молекулярно-генетических подходов и методов. Генетика. 49 (1): 55—72. (Grigoryan E. N., Markitantova Y. V., Avdonin P. P., Radugina E. A. 2013. Study of regeneration in amphibians in age of molecular-genetic approaches and methods. Russ. J. Genet. 49: 46—62.)
- Кузнецова А. В., Александрова М. А. 2016. Гетерогенность клеток ретинального пигментного эпителия глаза взрослого человека в различных системах культивирования. Клеточные технол. биол. мед. 4: 260—270. (Kuznetsova A. V., Aleksandrova M. A. 2017. Heterogeneity of retinal pigment epithelial cells from adult human eye in different culturing systems. Bull. Exp. Biol. Med. 162: 569—577.)
- Кузнецова А. В., Григорян Э. Н., Александрова М. А. 2011. Ретинальный пигментный эпителий глаза взрослого человека — потенциальный источник клеток для восстановления сетчатки. Цитология. 53 (6): 505—512. (Kuznetsova A. V., Grigoryan E. N., Aleksandrova M. A. 2011. Human adult retinal pigment epithelial cells as potential cell source for retina recovery. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 5 (5): 495—502.)
- Милюшина Л. А., Вердиев Б. И., Кузнецова А. В., Александрова М. А. 2012. Экспрессия мультипотентных и ретинальных маркеров в пигментном эпителии сетчатки глаза взрослого че-

- ловека *in vitro*. Клеточные технол. биол. мед. 1 : 44—51. (Milyushina L. A., Verdiev B. I., Kuznetsova A. V., Aleksandrova M. A. 2012. Expression of multipotent and retinal markers in pigment epithelium of adult human *in vitro*. Bull. Exp. Biol. Med. 153 (1) : 157—162.)
- Милушина Л. А., Кузнецова А. В., Григорян Э. Н. Александрова М. А. 2011. Фенотипическая пластичность клеток ретиального пигментного эпителия глаза взрослого человека *in vitro*. Клеточные технол. биол. мед. 2 : 71—77. (Milyushina L. A., Kuznetsova A. V., Grigoryan E. N., Aleksandrova M. A. 2011. Phenotypic plasticity of retinal pigment epithelial cells from adult human eye *in vitro*. Bull. Exp. Biol. Med. 151 (4) : 506—511.)
- Петров Ю. П., Кухарева Л. В., Крылова Т. А. 2013. Влияние коллагена I типа и фибронектина на морфологию мезенхимных клеток стромы человека в культуре. Цитология. 55 (7) : 452—562. (Petrov Y. P., Kukhareva L. V., Krylova T. A. 2013. The effect of type I collagen and fibronectin on the morphology of human mesenchymal stromal cells in culture. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 7 (6) : 545—555.)
- Шафеев Е. В., Куринов А. М., Кузнецова А. В., Александрова М. А. 2017. Репрограммирование клеток ретиального пигментного эпителия человека под влиянием bFGF *in vitro*. Клеточные технол. биол. мед. 2 : 128—137. (Shafei E. V., Kurinov A. M., Kuznetsova A. V., Aleksandrova M. A. 2017. Reprogramming of human retinal pigment epithelial cells under the effect of bFGF *in vitro*. Bull. Exp. Biol. Med. 163 (4) : 574—582.)
- Al-Hussaini H., Kam J. H., Vugler A., Semo M., Jeffery G. 2008. Mature retinal pigment epithelium cells are retained in the cell cycle and proliferate *in vivo*. Mol. Vis. 14 : 1784—1791.
- Baldwin A. K., Cain S. A., Lennon R., Godwin A., Merz C. L. R., Kielty C. M. 2014. Epithelial-mesenchymal status influences how cells deposit fibrillin microfibrils. J. Cell Sci. 127 (1) : 158—171. Doi: 10.1242/jcs.134270.
- Beckmann A., Schubert M., Hainz N., Haase A., Martin U., Tschernig T., Meier C. 2016. Ultrastructural demonstration of Cx43 gap junctions in induced pluripotent stem cells from human cord blood. Histochem. Cell Biol. 146 (5) : 529—537.
- Burke J. M., Hjelmeland L. M. 2005. Mosaicism of the retinal pigment epithelium: seeing the small picture. Mol. Interv. 5 (4) : 241—249. Doi: 10.1124/mi.5.4.7.
- Chen X., Xiao W., Liu X., Zeng M., Luo L., Wu M., Ye S., Liu Y. 2014. Blockade of Jagged/Notch pathway abrogates transforming growth factor β 2-induced epithelial-mesenchymal transition in human retinal pigment epithelium cells. Curr. Mol. Med. 14 (4) : 523—534.
- Chiba C. 2014. The retinal pigment epithelium: an important player of retinal disorders and regeneration. Exp. Eye Res. 123 : 107—114. Doi: 10.1016/j.exer.2013.07.009.
- Ezati R., Etemadzadeh A., Soheili Z., Samiei S., Pirmardan E. R., Davari M., Najafabadi H. S. 2018. The influence of rAAV2-mediated SOX2 delivery into neonatal and adult human RPE cells; a comparative study. J. Cell. Physiol. 233 (2) : 1222—1235.
- Ferguson L. R., Balaiya S., Mynampati B. K., Sambhav K., Chalam K. V. 2015. Deprivation of bFGF promotes spontaneous differentiation of human embryonic stem cells into retinal pigment epithelial cells. J. Stem Cells. 10 (3) : 159—170.
- Fuhrmann S., Zou C., Levine E. M. 2014. Retinal pigment epithelium development, plasticity, and tissue homeostasis. Exp. Eye Res. 123 : 141—150. Doi: 10.1016/j.exer.2013.09.003.
- Huang X., Wei Y., Ma H., Zhang S. 2012. Vitreous-induced cytoskeletal rearrangements via the Rac1 GTPase-dependent signaling pathway in human retinal pigment epithelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 419 (2) : 395—400. Doi: 10.1016/j.bbrc.2012.02.033.
- Islam M. R., Nakamura K., Casco-Robles M. M., Kunahong A., Inami W., Toyama F., Maruo F., Chiba C. 2014. The newt reprograms mature RPE cells into a unique multipotent state for retinal regeneration. Sci. Rep. 4 : 6043. Doi: 10.1038/srep06043.
- Koike C., Nishida A., Ueno S., Saito H., Sanuki R., Sato S., Furukawa A., Aizawa S., Matsuo I., Suzuki N., Kondo M., Furukawa T. 2007. Functional roles of Otx2 transcription factor in postnatal mouse retinal development. Mol. Cell. Biol. 27 (23) : 8318—8329.
- Kojima A., Nakahama K.-I., Ohno-Matsui K., Shimada N., Mori K., Iseki S., Sato T., Mochizuki M., Morita I. 2008. Connexin 43 contributes to differentiation of retinal pigment epithelial cells via cyclic AMP signaling. Biochem. Biophys. Res. Commun. 366 (2) : 532—538. Doi: 10.1016/j.bbrc.2007.11.159.
- Kuz'minykh E. V., Petrov Y. P. 2004. A simple model for the study of effects of the extracellular matrix on the cell morphology *in vitro*. Biochim. biophys. acta. 1671 (1—3) : 18—25. Doi: 10.1016/j.bbagen.2004.01.001.
- Kuznetsova A. V., Aleksandrova M. A., Kurinov A. M., Chentsova E. V., Makarov P. V. 2016. Plasticity of adult human retinal pigment epithelial cells. Int. J. Clin. Exp. Med. 9 (11) : 20 892—20 906. <http://ijcem.com/files/ijcem0033105.pdf>
- Kuznetsova A. V., Kurinov A. M., Aleksandrova M. A. 2014. Cell models to study regulation of cell transformation in pathologies of retinal pigment epithelium. J. Ophthalmol. 2014 : 1—18. Doi: 10.1155/2014/801787.
- Liu W., Jin G., Long C., Zhou X., Tang Y., Huang S., Kuang X., Wu L., Zhang Q., Shen H. 2013. Blockage of Notch signaling inhibits the migration and proliferation of retinal pigment epithelial cells. ScientificWorldJournal. 2013 : 178708. Doi: 10.1155/2013/178708.
- Lotz S., Goderie S., Tokas N., Hirsch S. E., Ahmad F., Corneo B., Le S., Banerjee A., Kane R. S., Stern J. H., Temple S., Fasanola C. A. 2013. Sustained levels of FGF2 maintain undifferentiated stem cell cultures with biweekly feeding. PLoS ONE. 8 (2) : e56289. Doi: 10.1371/journal.pone.0056289.
- Luz-Madrigal A., Grajales-Esquivel E., McCorkle A., Di Lorenzo A. M., Barbosa-Sabanero K., Tsonis P. A., Del Rio-Tsonis K. 2014. Reprogramming of the chick retinal pigmented epithelium after retinal injury. BMC Biol. 12 (1) : 28. Doi: 10.1186/1741-7007-12-28.
- Martinez-Morales J., Dolez V., Rodrigo I., Zaccarini R., Leconte L., Bovolenta P., Saule S. 2003. OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation. J. Biol. Chem. 278 (24) : 21 721—21 731.
- Martinez-Morales J. R., Signore M., Acampora D., Simeone A., Bovolenta P. 2001. Otx genes are required for tissue specification in the developing eye. Development. 128 (11) : 2019—2030.
- Murrell W., Palmero E., Bianco J., Stangeland B., Joel M., Paulson L., Thiede B., Grieg Z., Ramsnes I., Skjellegrind H. K., Nygard S., Brandal P., Sandberg C., Vik-Mo E., Palmero S., Langmoen I. A. 2013. Expansion of multipotent stem cells from the adult human brain. PLoS ONE. 8 (8) : e71334. Doi: 10.1371/journal.pone.0071334.
- Pittack C., Jones M., Reh T. A. 1991. Basic fibroblast growth factor induces retinal pigment epithelium to generate neural retina *in vitro*. Development. 113 (2) : 577—588.
- Reyes-Aguirre L. I., Lamas M. 2016. Oct4 methylation-mediated silencing as an epigenetic barrier preventing muller glia dedifferentiation in a murine model of retinal injury. Front. Neurosci. 10 : 523. Doi: 10.3389/fnins.2016.00523.
- Sakaguchi D. S., Janick L. M., Reh T. A. 1997. Basic fibroblast growth factor (FGF-2) induced transdifferentiation of retinal pigment epithelium: generation of retinal neurons and glia. Development. 123 (4) : 387—398.
- Salero E., Blenkinsop T. A., Corneo B., Harris A., Rabin D., Stern J. H., Temple S. 2012. Adult human RPE can be activated into a multipotent stem cell that produces mesenchymal derivatives. Cell Stem Cell. 10 (1) : 88—95. Doi: 10.1016/j.stem.2011.11.018.
- Sandberg C. J., Vik-Mo E. O., Behnan J., Helseth E., Langmoen I. A. 2014. Transcriptional profiling of adult neural stem-like cells from the human brain. PLoS ONE. 9 (12) : e114739. Doi: 10.1371/journal.pone.0114739.
- Schwegler J. S., Knorz M. C., Akkoyun I., Liesenhoff H. 1997. Basic, not acidic fibroblast growth factor stimulates proliferation of

cultured human retinal pigment epithelial cells. *Mol. Vis.* 3 : 10. <http://www.molvis.org/molvis/v3/a10/schwegler.pdf>

Spence J. R., Madhavan M., Aycinena J. C., Del Rio-Tsonis K. 2007. Retina regeneration in the chick embryo is not induced by spontaneous *Mitf* downregulation but requires FGF/FGFR/MEK/Erk dependent upregulation of Pax6. *Mol. Vis.* 13 : 57—65.

Theofilas P., Steinhäuser C., Theis M., Derouiche A. 2017. Morphological study of a connexin 43-GFP reporter mouse highlights glial heterogeneity, amacrine cells, and olfactory ensheathing cells. *J. Neurosci. Res.* 95 (11) : 2182—2194.

Tian J., Ishibashi K., Honda S., Boylan S. A., Hjelmeland L. M., Handa J. T. 2005. The expression of native and cultured human retinal pigment epithelial cells grown in different culture conditions. *Br. J. Ophthalmol.* 89 (11) : 1510—1517. Doi: 10.1136/bjo.2005.072108.

Vincent P. H., Benedikz E., Uhlen P., Hovatta O., Sundstrom E. 2017. Expression of pluripotency markers in nonpluripotent human neural stem and progenitor cells. *Stem Cells Develop.* 26 (12) : 876—887.

Wang S.-Z., Ma W., Yan R.-T., Mao W. 2010. Generating retinal neurons by reprogramming retinal pigment epithelial cells. *Expert Opin. Biol. Ther.* 10 (8) : 1227—1239. Doi: 10.1517/14712598.2010.495218.

Westenskow P. D., McKean J. B., Kubo F., Nakagawa S., Fuhrmann S. 2010. Ectopic *Mitf* in the embryonic chick retina by

co-transfection of β -catenin and *Otx2*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51 (10) : 5328—5335.

Woodbury M. E., Ikezu T. 2014. Fibroblast growth factor-2 signaling in neurogenesis and neurodegeneration. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 9 (2) : 92—101. Doi: 10.1007/s11481-013-9501-5.

Xiao W., Chen X., Liu X., Luo L., Ye S., Liu Y. 2014. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses proliferation and epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* 18 (4) : 646—655. Doi: 10.1111/jcmm.12212.

Zhao S., Thornquist S. C., Barnstable C. J. 1995. *In vitro* transdifferentiation of embryonic rat retinal pigment epithelium to neural retina. *Brain Res.* 677 (2) : 300—310.

Zhu J., Luz-Madriral A., Haynes T., Zavada J., Burke A. K., Del Rio-Tsonis K. 2014. β -Catenin inactivation is a pre-requisite for chick retina regeneration. *PLoS ONE.* 9 (7) : e101748. Doi: 10.1371/journal.pone.0101748.

Zhu J., Nguyen D., Ouyang H., Zhang X.-H., Chen X.-M., Zhang K. 2013. Inhibition of RhoA/Rho-kinase pathway suppresses the expression of extracellular matrix induced by CTGF or TGF- β in ARPE-19. *Int. J. Ophthalmol.* 6 (1) : 8—14. Doi: 10.3980/j.issn.2222-3959.2013.01.02.

Поступила 21 VI 2018

MECHANISMS OF DEDIFFERENTIATION OF THE ADULT HUMAN RETINAL
PIGMENT EPITHELIAL CELLS *IN VITRO*.
MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS

A. V. Kuznetsova, A. M. Kurinov,* L. A. Rzhanova, M. A. Aleksandrova

Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, 119334;

* e-mail: alexkur@rambler.ru

The change in the morphology and molecular-genetic profile of human retinal pigment epithelial (RPE) cells *in vitro* was studied under the influence of the basic fibroblast growth factor (bFGF). The cell morphology was assessed by the parameters of the area and perimeter of the cell, the spreading and polarization coefficients. It was shown that, 48 hours after the addition of the factor to the culture, the number of elongated (fibroblast-like) increased as well as the number of cells which size was smaller cells than in the control increased. Simultaneously, the proliferative activity of the cells decreased, which was determined by MTT test. Immunocytochemical analysis showed a decrease in staining for Cx43 and an intensification of staining for OTX2. Quantitative real-time PCR in RPE cells treated with bFGF revealed an increase in mRNA expression levels of *KLF4*, *OCT4*, *NANOG*, *OTX2*, and *NES* genes, with a simultaneous decrease in mRNA levels of *MITF* and *KRT18* genes, which indicates enhanced dedifferentiation. These data are confirmed by a decrease in the expression mRNA level of *COL1A1*, indicating a decline in the synthetic activity of the cells. The results indicate that a single (short-term) effect of bFGF is sufficient to activate a mechanism that lowers the level of cell differentiation toward the neuroepithelium.

Key words: adult human retinal pigment epithelium cells, basic fibroblast growth factor, cell area, cell perimeter, spreading coefficient, polarization coefficient, pluripotent markers