

ОТВЕТ КЛЕТОК РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА НА ВОЗДЕЙСТВИЕ КОНДИЦИОНИРОВАННЫХ СРЕД РЕГЕНЕРАТОРОВ СЕТЧАТОК ТРИТОНА

© 2020 г. Е. В. Шафеев^{1, *}, Л. А. Ржанова¹, Ю. П. Новикова¹, А. М. Куринов¹, Э. Н. Григорян¹, М. А. Александрова¹, А. В. Кузнецова^{1, **}

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334 Россия

*E-mail: elenashafei@gmail.com

**E-mail: avkuzn@list.ru

Поступила в редакцию 13.05.2020 г.

После доработки 30.05.2020 г.

Принята к публикации 31.05.2020 г.

Основываясь на консервативности развития сетчатки в ряду позвоночных и сигнальных путей, участвующих в этом процессе, была выдвинута гипотеза, что активные факторы, стимулирующие регенерацию сетчатки тритонов, способны вызывать трансдифференцировку клеток РПЭ человека. Для этого изучали действие кондиционированных сред (КС), полученных от регенерирующих *in vitro* сетчаток тритонов, на фенотип, экспрессию ряда генов и локализацию белков клеток ретинального пигментного эпителия человека (РПЭ) линии ARPE-19. В течение 120 ч культивирования наблюдали изменение морфологии клеток РПЭ человека, проявляющееся в изменении формы и увеличении размера клеток, которые сопровождалось снижением пролиферативной активности. Через 24 ч после воздействия КС в клетках ARPE-19 наблюдали краткосрочное повышение экспрессии гена *TUBB3* (паннейронального маркера) и снижение экспрессии генов белков-ингибиторов нейральной дифференцировки *BMP2* и *BMP4*. Иммуноцитохимическим (ИЦХ) методом на сроке 24–72 ч выявлено увеличение интенсивности окрашивания клеток антителами против белка βIII-тубулина при снижении окрашивания на белок щелевых контактов Sx43 по сравнению с контролем. Одновременно снижались уровни экспрессии мРНК генов РПЭ-маркеров *OTX2* и *KRT18*, а также гена *KLF4*, отвечающего за пролиферацию и дифференцировку. В то же время с помощью ИЦХ отмечено перераспределение локализации β-катенина из цитоплазматической мембраны в цитозоль. Для исключения мезенхимной, в частности остеогенной дифференцировки под влиянием КС, исследовали экспрессию генов *SPPI*, *RUNX2* (с помощью кПЦР) и показали отсутствие транскрипции *SPPI* в клетках ARPE-19 в контроле и под воздействием КС, а также снижение уровня экспрессии мРНК *RUNX2* под воздействием КС. Таким образом, через 24–72 ч после воздействия КС регенератов сетчаток тритона в клетках ARPE-19 наблюдается попытка выхода в нейрональную дифференцировку, о чем говорит увеличение транскрипции и трансляции βIII-тубулина, ослабление межклеточной адгезии и снижение экспрессии генов ингибиторов нейральной дифференцировки *BMP2* и *BMP4*, а также генов РПЭ-маркеров *OTX2* и *KRT18*. Однако затем, ввиду краткосрочного воздействия КС, во временном промежутке 72–120 ч наблюдается возврат клеток к исходной дифференцировке, о чем свидетельствует снижение экспрессии генов маркеров нейрональной дифференцировки (*NES*, *TUBB3*, *PAX6*) и увеличение экспрессии генов маркеров РПЭ (*OTX2*, *MITF*).

Ключевые слова: ретинальный пигментный эпителий, ARPE-19, кондиционированная среда, регенераты сетчаток тритонов, bFGF, пролиферация, дифференцировка, экспрессия генов, *KLF4*

DOI: 10.31857/S0041377120090060

Клетки ретинального пигментного эпителия (РПЭ) обладают способностью к репрограммированию, которая в ряду позвоночных проявляется в раз-

ной степени (Григорян, 2015, 2019). Хвостатые амфибии (Urodela) отличаются полной и совершенной формой регенерации — эпиморфной регенерацией ряда структур. Индуцированная удалением исходной сетчатки или перерезкой зрительного нерва регенерация сетчатки включает следующие этапы: дедифференцировку клеток РПЭ вплоть до приобретения ими черт “стволовости”, образование популяции нейробластов за счет деления малодифференцированных

Принятые сокращения: ИЦХ — иммуноцитохимия; кПЦР — количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени; КС — кондиционированная среда; РПЭ — ретинальный пигментный эпителий; ЭМП — эпителиально-мезенхимный переход; ЭСК — эмбриональные стволовые клетки.