

Регуляция нейральной дифференцировки клеток пигментного эпителия сетчатки *in vitro*

Научный руководитель – Александрова Мария Анатольевна

Шафеев Елена Валерьевна

Аспирант

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра эмбриологии, Москва, Россия

E-mail: elenamallakhova@gmail.com

Трансдифференцировка клеток пигментного эпителия сетчатки (РПЭ) является важной биомедицинской проблемой. Многие офтальмологические заболевания, в том числе и приводящие к полной потере зрения, вызываются нарушением целостности и функционирования РПЭ. Именно поэтому так важно исследовать пути регуляции клеточной судьбы. Фундаментальный и практический интерес состоит в возможности направлять клетки на пути необходимой дифференцировки. Такая контролируемая трансдифференцировка позволит регенерировать сетчатку естественным образом из собственных клеток. Также, это открывает перспективы заместительной терапии клетками, культивируемыми *in vitro*.

Целью данной работы было оценить способности РПЭ человека к нейральной трансдифференцировке в условиях *in vitro*.

Наиболее популярной моделью для исследования пигментного эпителия сетчатки человека является клеточная линия ARPE19. В данной работе исследовалось влияние основного фактора роста фибробластов (bFGF) на дифференцировку клеток ARPE19. Результаты оценивались методами иммуноцитохимии, Real time PCR и МТТ.

Уже через 24 часа стали заметны морфологические изменения формы клеток и формы колоний. Наблюдались как эпителио, так и нейроноподобные клетки. Через 120 часов в культуре наблюдалось большое количество клеток нейроноподобной морфологии, с длинными аксоноподобными отростками. Иммуноцитохимическое исследование выявило усиление окраски на TUBB3 в клетках с нейроноподобной морфологией, а также снижение экспрессии Cx43, что свидетельствует о потере эпителиальной дифференцировки.

Исследование методом Real-time PCR показало изменения в экспрессии генов плюрипотентности (Oct4, Nanog, Sox2, Klf4), генов, специфичных для РПЭ (Mitf) и генов-индикаторов нейральной дифференцировки (Pax6, TUBB3). В группе с добавлением bFGF наблюдалось возрастание экспрессии KLF4 сопровождавшееся значимым падением экспрессии Pax6, MITF и Otx2 - специфических маркеров дифференцировки РПЭ. Наиболее высокий уровень экспрессии мРНК Klf4 наблюдался через 72 часа, затем, он резко падал к 120 часам. Это сопровождалось возвратом экспрессии Pax6, MITF и Otx2 к базовому уровню и трехкратным ростом экспрессии мРНК TUBB3.

Из этого можно сделать вывод о дифференцировке клеток в 2-х направлениях: по пути нейральной дифференцировки и по пути РПЭ. Таким образом, клетки РПЭ человека способны трансдифференцироваться в нейральные клетки в культуре *in vitro*.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-04-00658