

РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ КЛЕТОК РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА ПОД ВЛИЯНИЕМ bFGF *IN VITRO*

Е.В.Шафеи, А.М.Куринов, А.В.Кузнецова, М.А.Александрова

ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН, Москва, РФ

Изучали влияние bFGF на репрограммирование клеток ретинального пигментного эпителия человека *in vitro*. В клетках линии ARPE-19 после добавления bFGF отмечено увеличение экспрессии мРНК *KLF4* и снижение экспрессии мРНК *PAX6*, *MITF* и *OTX2* — специфичных для ретинального пигментного эпителия. Самый высокий уровень экспрессии мРНК *KLF4* отмечен через 72 ч после добавления bFGF, затем он резко снижался, что сопровождалось 3-кратным увеличением экспрессии мРНК *TUBB3*, нейронального маркера. Иммуноцитохимическое исследование показало, что под влиянием bFGF часть клеток сохраняла эпителиальные свойства и окрашивалась на коннексин-43, а другая — имела длинные аксоноподобные отростки и окрашивалась на β III-тубулин, что свидетельствует о трансдифференцировке по нейрональному пути. Несмотря на доминирование эпителиальных свойств, клетки ARPE-19 под влиянием bFGF способны проявлять пронеурональные свойства.

Ключевые слова: ретинальный пигментный эпителий, ARPE-19, bFGF, нейрональная дифференцировка, иммуноцитохимия

Репрограммирование соматических клеток в нейральные — актуальная проблема регенеративной медицины, направленная на реконструкцию нервной ткани [8]. Для восстановления сетчатки глаза интерес представляют клетки ретинального пигментного эпителия (РПЭ), играющие ключевую роль в обеспечении функции, гомеостаза и регенерации сетчатки. Несмотря на то что нейроны сетчатки и РПЭ образуются из единой нейроэпителиальной закладки, только клетки РПЭ обладают способностью к репрограммированию или трансдифференцировке в нейроны, которая, однако, в различных классах позвоночных проявляется в разной степени [10]. Клетки РПЭ низших позвоночных после повреждения сетчатки репрограммируются в клетки, подобные стволовым клеткам нейроэпителия, потомки которых дифференцируются во все нервные клетки сетчатки, включая фоторецепторы, пигментный эпителий, и полностью восстанавливают функцию сетчатки [10]. Одним из ключевых регуляторов де- и трансдифференцировки РПЭ у низших позвоночных с высокой способностью к регенерации является bFGF [11,24]. У птиц и млекопитающих репрограммирование РПЭ происходит в ранние периоды эмбрионального развития только под влиянием

bFGF [17], а у взрослых особей — при инсерции пронеурональных генов *Pax6* [3], *Neurogenin* [29]. У человека трансдифференцировка РПЭ в нейрональные клетки происходит лишь на ранних этапах эмбриогенеза. Однако у взрослых людей внешне стабильная популяция клеток РПЭ обнаруживает пластичность при воздействии патологических индукторов *in vivo*, и клетки репрограммируются в фибробластоподобные, что вызывает повреждение сетчатки и, как следствие, нарушение зрения [27]. В то же время, если клетки РПЭ взрослого человека поместить *in vitro*, в них проявляются свойства своеобразных мультипотентных стволовых клеток, которые в определенных условиях дифференцируются в нейральные и мезенхимные клетки [1,25]. Ранее мы показали, что *in vitro* клетки РПЭ человека утрачивают пигментацию и специфические маркеры РПЭ (*RPE65*), дедифференцируются, экспрессируют маркеры стволовых (*OCT4*, *NANOG*) и нейрональных клеток сетчатки (*PROX1*, *PAX6*, *Musashi-1*, *TUBB3*) [1,21]. Молекулярно-генетические изменения в клетках человека *in vitro* в общих чертах сходны с таковыми у низших позвоночных *in vivo* [10], что указывает на консервативность механизмов репрограммирования РПЭ. Однако репрограммирование клеток РПЭ взрослого человека *in vitro* поддерживается непродолжительное время, что ставит вопрос о поиске факторов для его стимуляции и поддержания.

Адрес для корреспонденции: mariaaleks@inbox.ru. Александрова М.А.



Целью данной работы являлось изучение механизмов репрограммирования РПЭ человека *in vitro* под влиянием bFGF — ключевого фактора при трансдифференцировке РПЭ у низших позвоночных, эмбрионов птиц и млекопитающих [10,18]. bFGF координирует развитие нейронов сетчатки [17], а также поддерживает статус многих типов стволовых и плюрипотентных клеток [16].

Методика исследования

Культивирование клеток. Использовали линию клеток ARPE-19 пигментного эпителия сетчатки взрослого человека [7], предоставленную О.Ю.Плетюшкиной (НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ им. М.В.Ломоносова). Для стабилизации культуры клетки после размораживания субкультивировали в течение 3 пассажей в ростовой среде DMEM/F-12 (“Sigma-Aldrich”), дополненной 10% ЭТС (“Gibco”), L-глутамином (2 мМ; “Sigma-Aldrich”), 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (“Pan Biotech”), при 37°C и 5% CO₂. Пассирование клеток проводили смесью растворов 0.25% трипсина и 0.48 мМ версена (“Gibco”, “Invitrogen”) в соотношении 1:3. Для оценки действия bFGF фактор добавляли в количестве 20 нг/мл в ростовую среду того же состава, но с разным содержанием ЭТС (0 или 1%). Клетки ARPE-19 в концентрации 0.5–0.7×10⁴/см² высаживали в культуральные флаконы для адгезивных культур “T-25 Greiner CELLSTAR” (“Greiner Bio-One GmbH”) с добавлением 1% ЭТС или во флаконы для суспензионных культур “T-25 Greiner CELLSTAR” без ЭТС. Контролем служили клетки, культивированные без bFGF. Клетки исследовали с помощью инвертированного микроскопа “Olympus CKX31” через 24, 48, 72 и 120 ч. В течение 120 ч культивирования среду не меняли. Фотографии получали с помощью микроскопа “Olympus” с цифровой камерой DP70.

Морфометрический анализ сферических клеточных агрегатов. Размеры клеточных агрегатов оценивали по изображениям в программе “ImageJ1.48” (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), которая рассчитывала площадь (Area) проекции единичных клеток и агрегатов на подложке (далее — площадь объекта), периметр объекта (Perimeter), большую (M) и малую (m) оси эллипса, описанного вокруг объекта, количество объектов. Для контрольной и опытной групп использовали по 3–5 фотографий независимых полей с масштабным увеличением 100; было подсчитано не менее 250 объектов (клеток и клеточных агрегатов). Для оценки статистической значимости различий между группами использовали *t* критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при *p*<0.01.

Оценка пролиферативной активности клеток (МТТ-тест). Клетки ARPE-19 рассевали в 96-луночные планшеты (“Greiner Bio-One GmbH”) в концентрациях 0.3, 0.6, 1.2, 2.4 и 4.8×10⁴/см². Инкубирование проводили в течение 24 ч в среде DMEM/F-12 с 1% ЭТС без (контроль) и с добавлением 20 нг/мл bFGF при 37°C и 5% CO₂. За 3 ч до окончания инкубационного периода в каждую лунку добавляли матричный раствор МТТ (5 мг/мл; “Sigma-Aldrich”) в соотношении 1:10 к объему ростовой среды. По окончании инкубации супернатант удаляли, добавляли 100 мкл ДМСО (“Applichem”) и ресуспендировали осадок. Анализ оптической плотности проводили на планшетном анализаторе “StatFax 2100” (“Awareness Technology Inc.”) при 545 нм и корректирующем фильтре 630 нм. Для вычисления средних значений оптической плотности (при числе повторов *n*=8) и стандартных отклонений использовали программу “Microsoft Excel 2007”. Для оценки статистической значимости различий между группами применяли *t* критерий Стьюдента. Влияние bFGF на пролиферативную активность клеток считали установленным при различиях на уровне значимости *p*<0.01. Пролиферацию клеток (%) вычисляли по формуле: пролиферация клеток=($[\text{OD}] \text{ bFGF} / [\text{OD}] \text{ контроль}$)×100%, где OD — среднее значение оптической плотности образца при 545 нм.

Иммуноцитохимическое исследование клеток. Клетки пигментного эпителия ARPE-19 в концентрации 0.5–0.8×10⁴/см² высаживали на круглые стекла 24-луночных планшетов (“CellStar”) в среде DMEM/F-12 с 1% ЭТС с добавлением 20 нг/мл bFGF или без (контроль) и культивировали в течение 24, 48 и 120 ч. Затем клетки отмывали от культуральной среды ФСБ и фиксировали 4% раствором параформальдегида (“Sigma-Aldrich”) в ФСБ в течение 5 мин. Препараты хранили в смеси глицерина и этиленгликоля при -20°C до проведения иммуноцитохимического окрашивания.

Дифференцировку клеток ARPE-19 оценивали иммунофлуоресцентным методом, используя первичные антитела к коннексину-43 (Cx43, C6219, lot: 102K4859 1:200; кроличьи поликлональные; “Sigma-Aldrich”) и βIII-тубулину (ab7751 lot: 754961 1:200; мышинные моноклональные; “Abcam”), разведенные в 0.1% растворе БСА (“Sigma”). Опытные и контрольные клетки ARPE-19 обрабатывали параллельно для последующего проведения сравнительного анализа. Обработка включала блокировку неспецифического связывания 10% козьей сывороткой, инкубацию с первичными антителами при 4°C в течение ночи, связывание первичных антител с соответствующими вторичными антителами, меченными флюорохромами Alexa Fluor 488 или 594 (1:300; “Molecular Probes”), в течение 40 мин



при комнатной температуре, заключение в среду с ядерным красителем DAPI ("Vectashield"; "Vector Laboratories"). Оценку результатов иммуноцитохимических реакций и фотографирование проводили с помощью микроскопа "Olympus CKX31" с цифровой камерой DP70 или микроскопа "Opton" с цифровой камерой "Olympus SP-350".

Количественная ПЦР в реальном времени (кПЦР). Выделение тотальной РНК из культуры клеток проводили с помощью "TRI Reagent" ("Sigma-Aldrich") в соответствии с инструкцией производителя. Для этого "TRI Reagent" добавляли во флаконы с клетками через 24, 48, 72 и 120 ч после высевания клеток ARPE-19 в среду с 1% ЭТС, содержащую или не содержащую (контроль) bFGF. Синтез кДНК проводили с помощью набора "RevertAid H Minus Kit" ("Fermentas") в объеме 20 мкл, используя 1 мкг тотальной РНК, обработанной ДНКазой.

Методом кПЦР оценивали изменения уровня экспрессии мРНК следующих генов транскрипционных факторов, сигнальных белков и маркеров дифференцировки: *MITF*, *OTX2*, *PAX6*, *TUBB3*, *NANOG*, *OCT4*, *SOX2* (праймеры и зонды "ДНК-

Синтез"), *KLF4* (праймеры предоставлены Э.Б. Дашинимаяевым, Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН). В качестве эндогенного контроля использовали *GAPDH* (праймеры и зонд "ДНК-Синтез"). Смесь реагентов для кПЦР (25 мкл) включала 2 mM MgCl₂, 200 мкМ dNTPs, 1 Ед Maxima HS Taq-полимеразы ("Fermentas"), 5 мкл разведенной кДНК (эквивалентной 4 нг исходной тотальной РНК), 250 нМ праймеров и 250 нМ зонда (табл. 1). кПЦР проводили на приборе "ABI Prism 7500 PCR system" ("Applied Biosystems"). Программа для ПЦР включала: 1 цикл денатурации при 95°C — 3 мин, 40 циклов денатурации при 95°C — 15 с и совмещенный этап отжига-синтеза при 60°C — 1 мин. Пороговый цикл определяли, применяя программное обеспечение "500 Software 2.0.1" ("Applied Biosystems"). Экспрессию каждой мРНК определяли постановкой двух ПЦР в двух повторях. Обработка данных кПЦР включала усреднение значений Ct для повторных точек в эксперименте, расчет значений относительной экспрессии исследуемых генов методом $\Delta\Delta Ct$ для каждого образца с использованием значения Ct по гену *GAPDH* в качестве нормирующего. Результаты

Таблица 1. Праймеры, использованные для кПЦР

Ген (Ref_Seq)	Последовательность праймеров или каталожный номер	Размер ампликона, п.н.
<i>MITF</i> (NM_198159)	F-5'-CACCAGCCATAAACGTCAGTGT-3' R-5'-CGAGGTGGGTCTGCACCTT-3' Зонд-FAM-CCACCACCTTCCCTCTGCCAC-BHQ1	87
<i>PAX6</i> (NM_001604)	F-5'-CAATTCCACAACCCACCACAC-3' R-5'-CTGTAGGTGTTTGTGAGGGCTGT-3' Зонд-5'-FAM-TCCTCCTTCACATCTGGCTCCATGT-BHQ1	88
<i>TUBB3</i> (NM_006086)	F-5'-GGGCCAAGTTCTGGGAAGTC-3' R-5'-CGAGTCGCCCACGTAGTTG-3' Зонд-5'-FAM-ATGAGCATGGCATCGACCCAGC-BHQ1-3'	71
<i>GAPDH</i> (NM_002046)	<i>GAPDH_oligos</i>	220
<i>OCT4</i> (NM_002701)	F-5'-GAACCGAGTGAGAGGCAACC-3' R-5'-ATAGTCGCTGCTTGATCGCTT-3' Зонд-5'-FAM-CAGTGCCCCGAAACCCACACTGC-BHQ1-3'	163
<i>SOX2</i> (NM_003106.3)	F- 5'-TGCGAGCGCTGCACAT-3' R-5'-GCAGCGTGTACTTATCCTTCTTCA-3' Зонд-5'-FAM-CCGGCGGAAACCAAGACGCT-BHQ1-3'	93
<i>NANOG</i> (NM_024865)	F-5'-GAAATACCTCAGCCTCCAGCA-3' R-5'-TGCCACCTCTTAGATTTTATTCTC-3' Зонд-5'-FAM-CTCTCCAACATCCTGAACCTCAGCTACA-BHQ1-3'	111
<i>OTX2</i> (NM_001270525, NM_021728)	F-5'-ATGGACTTGCTGCACCCCT-3' R-5'-CAAACAGTGCTTCCAGCACATC-3' Probe-5'-VIC-GGGCTACCCGCCACCC-3'	109
<i>KLF4</i> (NM_001314052.1)	F-5'-ACCAGGCACTACCGTAAACACA R-5'-GGTCCGACCTGGAAATGCT	79



представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Для оценки статистической значимости различий использовали *t* критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0.01$.

Результаты исследования

Характеристика морфологии клеток ARPE-19 в разных условиях культивирования. В присутствии сыворотки клетки ARPE-19, как и клетки из первичного материала [19], формировали адгезивную культуру, гетерогенную по морфологии. Концентрация ЭТС (1 или 10%) не оказывала значимого влияния на рост и дифференцировку клеток: они имели схожие темпы роста и идентичную морфологию. В центре плотно упакованных колоний располагались клетки полигональной формы, а по периферии — вытянутые веретеновидные (рис. 1, а). Кроме них встречались фибробластоподобные клетки и единичные клетки с вытянутыми отростками. При концентрации клеток $0.7 \times 10^4/\text{см}^2$ их плотность достигала 80-90% культуральной поверхности через 5-6 сут культивирования. В местах плотного монослоя в среде с ЭТС на поверхности распластанных клеток образовывались сферические клеточные агрегаты (рис. 1, б). Формирование подобных агрегатов наблюдали ранее на поверхности монослоя первичных клеток РПЭ человека [1,14].

При пассивировании и переводе клеток ARPE-19 на бессыывороточную среду через 72 ч после добавления bFGF отмечено образование сфери-

ческих агрегатов из 2-4 клеток, которые прикрепились к неадгезивному пластику (рис. 1, в-е). Через 120 ч после добавления bFGF отмечено 2-кратное увеличение процентного содержания агрегатов в клеточной популяции по сравнению с контролем, а также увеличение среднего размера агрегатов и изменение их распределения по размеру в пользу фракции $>500 \text{ мкм}^2$ (табл. 2).

Образование подобных агрегатов описано ранее для клеток РПЭ взрослого человека [1,14,19] и плодов человека 9-11.5 нед развития [20]. В отличие от клеток РПЭ, полученных из первичного материала, клетки линии ARPE-19 образовывали только агрегаты и не формировали второй субпопуляции из распластанных клеток, как это описано в работе [14], что может быть связано с использованием флаконов с различной адгезивностью. Образование сферических агрегатов может свидетельствовать о присутствии клеток со свойствами плюри- и/или мультипотентности [2,25].

При добавлении bFGF в среду с 1% ЭТС через 24 ч отмечалось изменение морфологии клеток и структуры колоний (рис. 2): клетки становились менее вытянутыми, наблюдалось формирование рыхлых колоний. Такую морфологию клетки сохраняли вплоть до 72 ч культивирования. Через 120 ч в их морфологии происходили существенные изменения. Часть клеток сохраняла полигональную форму, в то время как около 20% клеток приобретали вытянутую форму и формировали длинные аксоноподобные отростки (рис. 2, е).

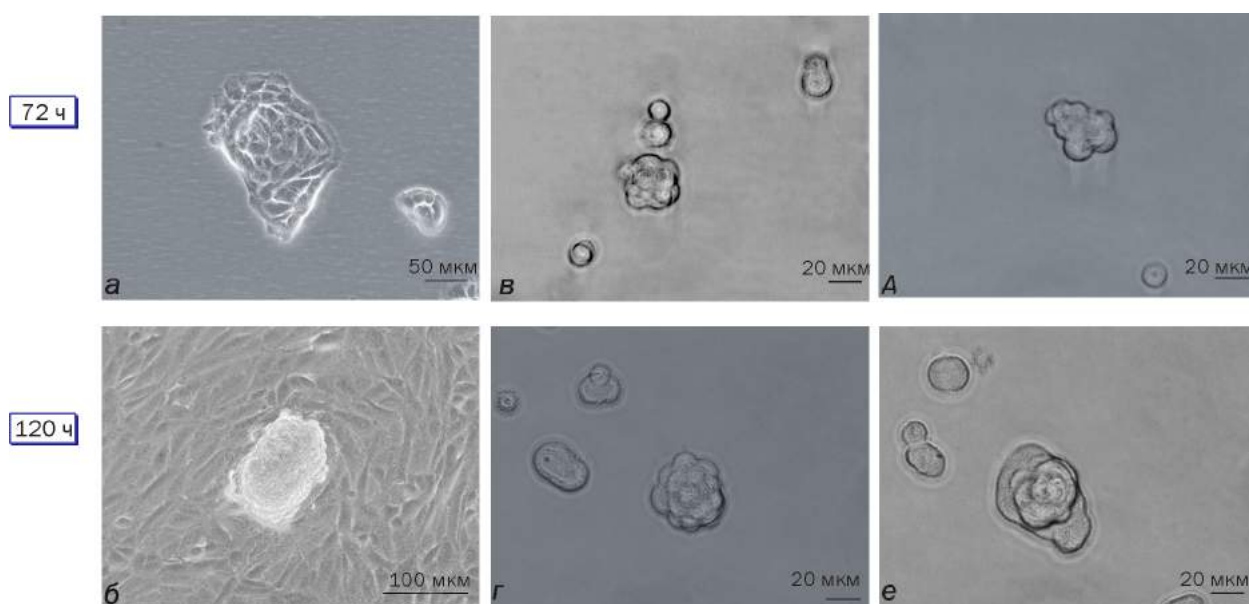


Рис. 1. Морфология клеток ARPE-19 в среде, содержащей 1% ЭТС (а, б), в среде без ЭТС и bFGF (д, е) через 72 ч и 120 ч после начала культивирования. Фазовый контраст, $\times 200$.

а — колония из распластанных клеток; б — образование сферических клеточных агрегатов на поверхности монослоя; в-е — сферические клеточных агрегаты, прикрепленные к пластику.

Подобные изменения в морфологии клеток ARPE-19 наблюдали в работе [5] при использовании активатора нейрональной дифференцировки фенретида (производное ретиноевой кислоты).

Увеличение пролиферации клеток под действием bFGF (МТТ-тест). Оптимальная минимальная концентрация клеток ARPE-19, при которой отмечено достоверное увеличение их пролиферативной активности под влиянием bFGF,

составила $0.6 \times 10^4/\text{см}^2$. Пролиферация клеток увеличилась приблизительно на 20% по сравнению с контролем (рис. 3). При высокой исходной концентрации ($4.8 \times 10^4/\text{см}^2$) рост клеток замедлялся, что, вероятно, связано с контактным торможением. Полученные результаты не противоречат ранее полученным данным о том, что экзогенный bFGF стимулирует пролиферацию клеток линии D407 человека и первичной культуры РПЭ свиньи [26].

Таблица 2. Морфометрический анализ сферических клеточных агрегатов ($M \pm \sigma$)

Показатель	Время культивирования			
	72 ч		120 ч	
	контроль	+bFGF	контроль	+bFGF
Количество агрегатов, %	20.5±9.4	22.5±1.1	18.2±3.3	35.8±9.5*
Распределение агрегатов по размеру, %				
100-300 мкм ²	52.2	46.3	23.5	12.3
300-500 мкм ²	43.5	52.7	47.1	46.6
>500 мкм ²	4.3	0	29.4	41.1
Средний размер агрегатов, мкм ²	302.2	258.8	451.7	585.5

Примечание. * $p < 0.01$ по сравнению с контролем.

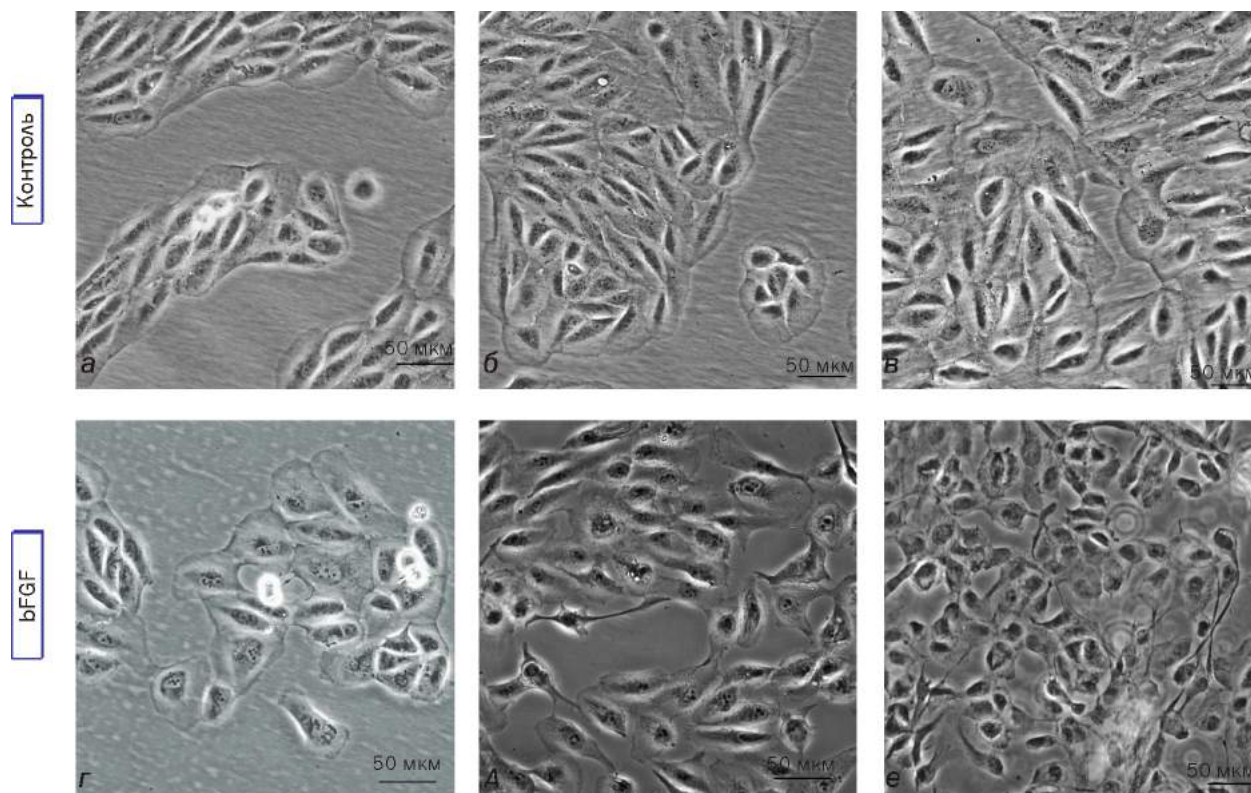


Рис. 2. Морфологическая характеристика клеток ARPE-19 через 24 ч (а, г), 48 ч (б, д) и 120 ч (в, е) после инкубации с bFGF. Фазовый контраст, $\times 200$.

а-в — клетки удлинённой формы, плотно упакованные в колониях; г — клетки полигональной формы; д — появление единичных клеток с отростками, разобщение клеток в колониях; е — около 20% клеток имеют отростчатую морфологию.



Иммуноцитохимический анализ маркеров дифференцировки. Sx43 (ключевой белок щелевых контактов) и β III-тубулин (маркер ранней фазы дифференцировки нейронов сетчатки: колбочек, горизонтальных, амакриновых и ганглиозных клеток) экспрессировались в контрольной, и в опытной группе клеток. Однако интенсивность окрашивания и распределение числа клеток, несущих эти маркеры, менялось со временем культивирования. Так, через 24 ч после добавления

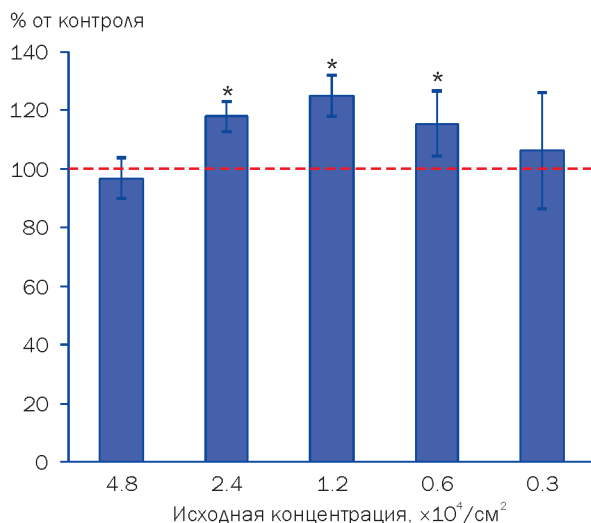


Рис. 3. Влияние bFGF на пролиферативную активность клеток ARPE-19 (данные МТТ-теста).

* $p < 0.01$ по сравнению с контролем (100%).

bFGF существенной разницы в экспрессии Sx43 и β III-тубулина по сравнению с контролем не выявлено: во всех клетках наблюдалась слабая интенсивность сигнала на β III-тубулин, а на их поверхности в местах контакта с соседними клетками — Sx43⁺-окрашивание (рис. 4, а, г). Через 48 ч после добавления bFGF наблюдалось снижение интенсивности окрашивания на Sx43 и появление ламеллярного окрашивания на β III-тубулин (рис. 4, д), через 120 ч выявлялось усиление иммунофлуоресцентного сигнала на β III-тубулин, в том числе в клетках с длинными аксоноподобными отростками, а Sx43⁺-окрашивание определялось на поверхности лишь небольшого числа клеток (рис. 4, е).

Полученные данные свидетельствуют о понижении эпителиальной и начале нейрональной дифференцировки клетками ARPE-19, которые в норме представляют собой эпителиоподобные клетки и экспрессируют Sx43 (рис. 4, б, в). Sx43 играет важную роль в дифференцировке РПЭ [12]. Выключение Sx43 в клетках человека, трансфицированных конструкцией, несущей крысиный Sx43, ингибировало дифференцировку, тогда как гиперэкспрессия Sx43 индуцировала дифференцировку клеток РПЭ в условиях дедифференцировки.

Анализ экспрессии генов плюрипотентности и дифференцировки методом КПЦР. Профиль экспрессии мРНК в контроле (табл. 3) характеризовался отсутствием SOX2 и чрезвычайно низким уровнем экспрессии маркеров плюрипотентности OCT4 и NANOG, за исключением KLF4.

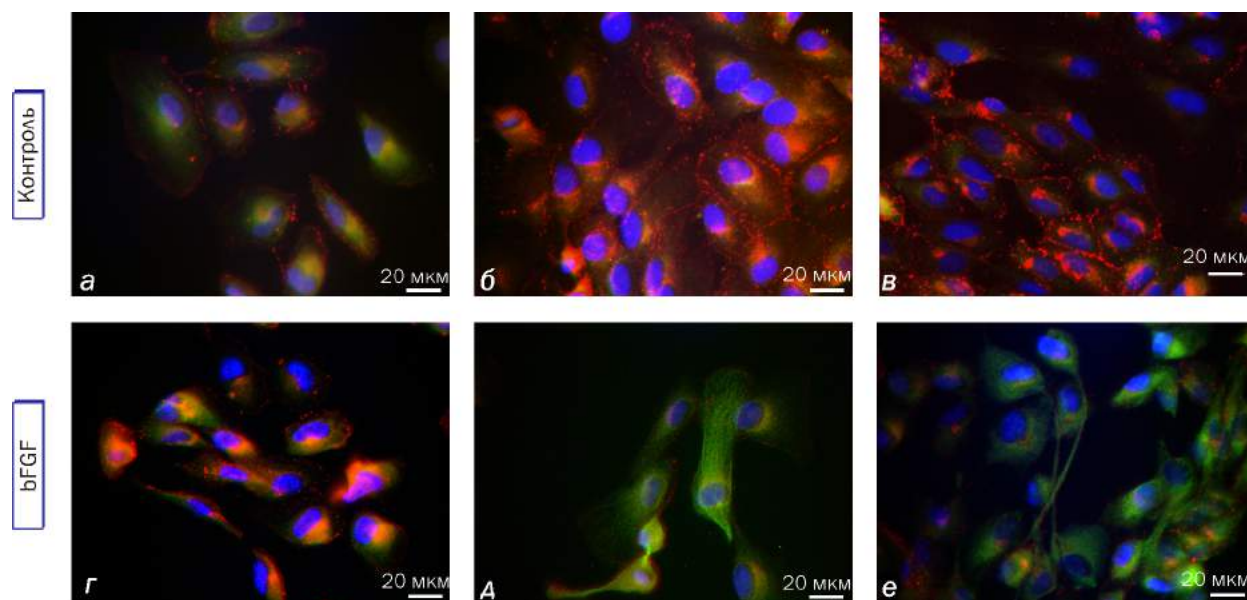


Рис. 4. Иммуноцитохимическая характеристика клеток ARPE-19 через 24 ч (а, г), 48 ч (б, д) и 120 ч (в, е) после инкубации с bFGF. Иммунофлуоресцентный метод. Двойное окрашивание на Sx43 (красное свечение) и β III-тубулин (зеленое свечение), ядра окрашены DAPI (синее свечение).



В то же время отмечался высокий уровень экспрессии как маркеров РПЭ дифференцировки (*MITF*, *PAX6*), так и маркера нейрональной дифференцировки *TUBB3*. Таким образом, можно полагать, что изначально дедифференцированные клетки ARPE-19 обладают способностью к дифференцировке в нейроноподобные клетки и в РПЭ.

Анализ результатов кПЦР показал, что через 24 ч после добавления bFGF в клетках существенно увеличивался уровень экспрессии мРНК *KLF4*, в то время как экспрессия всех остальных исследованных генов изменялась незначительно (рис. 5).

Увеличение экспрессии *KLF4* через 48 ч после добавления bFGF сопровождалось значимым снижением экспрессии *PAX6*, *MITF* и *OTX2* — специфических маркеров дифференцировки РПЭ. Наивысший уровень экспрессии мРНК *KLF4* наблюдался через 72 ч после добавления bFGF, затем он резко снижался к 120 ч (рис. 5), что сопровождалось возвратом экспрессии *PAX6*, *MITF* и *OTX2* к базовому уровню и 3-кратным ростом экспрессии мРНК *TUBB3*. Полученные данные свидетельствуют о начале процесса дифференцировки клеток по двум направлениям: РПЭ и нейрональному. Экспрессия мРНК генов плюрипотентности *OCT4* и *NANOG* находилась на контрольном уровне и значимо не изменялась. мРНК *SOX2* в клетках не детектировалась, что, по-видимому, связано с взаимоисключающим высоким уровнем экспрессии *TUBB3* [28]. Результаты кПЦР в целом согласуются с данными морфологического и иммуноцитохимического анализа, показавшими, что линия ARPE-19 гетерогенна по составу клеток. Под влиянием bFGF часть клеток сохраняет эпителиальные свойства, они окрашиваются антителами на Сх43 и не изменяют характера дифференцировки в течение всего времени эксперимента. В другой части клеток не выявляется маркер РПЭ Сх43, а экспрессируется βIII-тубулин, клетки

Таблица 3. Профиль экспрессии мРНК в контрольной культуре ARPE-19 ($M \pm \sigma$)

Ген	Экспрессия мРНК относительно <i>GAPDH</i> , $\times 10^6$
<i>SOX2</i>	—
<i>OCT4</i>	7.0 ± 1.3
<i>NANOG</i>	17.9 ± 5.9
<i>KLF4</i>	412.8 ± 42.9
<i>OTX2</i>	34.5 ± 1.4
<i>MITF</i>	3051.0 ± 567.5
<i>PAX6</i>	$10\ 811.8 \pm 1600.1$
<i>TUBB3</i>	2350.2 ± 202.1

Примечание. “—” — отсутствие экспрессии.

приобретают длинные аксоноподобные отростки и трансдифференцируются по нейрональному пути.

Благодаря линейным свойствам и способности образовывать эпителиальный слой, подобный нативному РПЭ, клетки ARPE-19 широко используются как альтернатива интактному РПЭ человека [15]. Линия ARPE-19 получена в результате длительной ферментативной обработки первичной культуры РПЭ человека, в ходе которой были отобраны клетки, обладающие выраженной адгезией к культуральному пластику и высокой пролиферативной активностью, формирующие при длительном культивировании монослой в виде “булыжной мостовой” [7]. Доминирование эпителиальных свойств ставит вопрос о возможности использования этой линии клеток для изучения механизмов их трансдифференцировки в нейроны, что можно наблюдать при использовании первичных клеток РПЭ человека [13]. Однако эксперименты [6] показали, что фенретинид индуцировал дифференцировку ARPE-19 в нейроноподобные клетки, усиливая экспрессию нейронального маркера βIII-тубулина и подавляя экспрессию маркера прогениторных клеток *Pax6*. Результаты работы

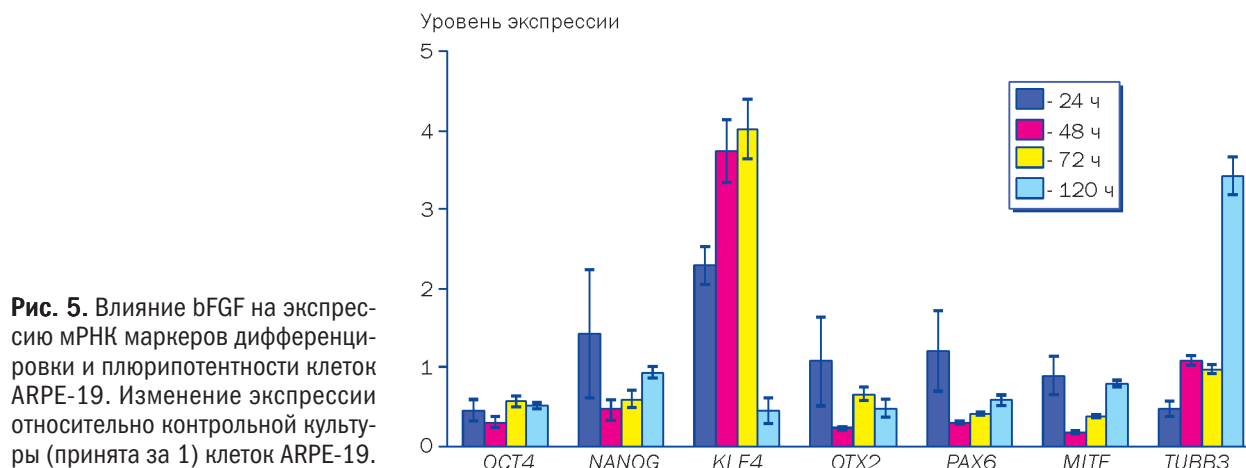


Рис. 5. Влияние bFGF на экспрессию мРНК маркеров дифференцировки и плюрипотентности клеток ARPE-19. Изменение экспрессии относительно контрольной культуры (принята за 1) клеток ARPE-19.



привели исследователей к мысли о том, что линия ARPE-19 содержит малодифференцированные клетки [6]. Последующие исследования подтвердили, что в стандартных условиях культивирования ARPE-19 экспрессируют транскрипционные факторы *PAX6*, *SOX2*, *CRX* и *NRL* и утрачивают маркеры РПЭ, что указывает на дедифференцированное состояние клеток. Добавление в среду фенретионида индуцирует значительное повышение экспрессии маркеров фоторецепторных клеток, что указывает на возможность клеток ARPE-19 дифференцироваться по нейрональному пути [5].

Помимо ретиновой кислоты мощным активатором нейрональной дифференцировки является bFGF. Ранее установлено, что у амфибий РПЭ трансдифференцируется в нейроны и глию, и именно bFGF вовлечен как главный фактор в индукцию регенерации сетчатки [24]. Если bFGF добавлять в культуру глазного пузырька куриного эмбриона, то уже сформированный РПЭ дедифференцируется и претерпевает нейрональную дифференцировку, что приводит к образованию второго слоя сетчатки. Нейтрализация bFGF антителами, напротив, блокирует развитие нейронов сетчатки, не влияя на дифференцировку РПЭ [23]. У млекопитающих (крыс) РПЭ трансдифференцируется в нейрональную сетчатку на ранних стадиях эмбриогенеза (12-14 сут), и, поскольку его конверсия в нейроны не сопряжена с пролиферацией клеток, было предположено, что bFGF способен напрямую изменять транскрипцию в клетках-предшественниках РПЭ [30]. В работе [26] и в проведенном нами исследовании показано, что в культуре РПЭ человека bFGF стимулирует пролиферацию.

Тот факт, что bFGF имеет решающее значение для развития ЦНС из стволовых нейроэпителиальных клеток, объясняет необходимость его участия во взрослом нейрогенезе, где он регулирует стволовые клетки в нейрогенных нишах мозга. Установлено, что bFGF — необходимый фактор для поддержания статуса многих типов стволовых и плюрипотентных клеток [16]. Открытие стволовых мультипотентных клеток и описание их молекулярного профиля в РПЭ человека *in vitro* [1,20,25] выявило сходство механизмов трансдифференцировки РПЭ с процессами репрограммирования клеток [10]. Ранее методами ПЦР и иммуноцитохимии нами показано, что в первичных клетках РПЭ взрослого человека в ходе дедифференцировки присутствуют клетки, экспрессирующие *OCT4* и *NANOG* [1,20]. Другие исследователи обнаружили при трансдифференцировке РПЭ взрослого человека высокий уровень экспрессии мРНК *c-MYC* и *KLF4*, низкий уровень *SOX2* и отсутствие экспрессии *OCT4*, *NANOG* и *LIN28* [25]. Дифференцировку по нейрональному

пути проводили в среде с добавлением bFGF и ретиновой кислоты одновременно [25], в то время как проведенные нами исследования показывают, что в клетках ARPE-19 для активации нейрональной дифференцировки достаточно влияния bFGF. Поскольку *KLF4* — один из четырех факторов, участвующих в репрограммировании соматических клеток в индуцированные плюрипотентные, можно полагать, что усиление экспрессии *KLF4* под влиянием bFGF приводит к временно, еще большему снижению уровня дифференцировки клеток ARPE-19 до плюри/мультипотентного статуса, о чем также свидетельствует подавление экспрессии РПЭ специфичного фактора *MITF* [22]. Снижение уровня дифференцировки приводит клетки к пролиферации и активации программы нейрональной дифференцировки [4]. Также известно, что при развитии сетчатки *KLF4* играет двойную роль: устанавливает статус стволовых клеток в ретинальных прогениторах и подавляет развитие и рост аксонов в нейронах [9]. Это согласуется с полученными нами данными о том, что уровень экспрессии *KLF4* значимо возрастает в период дедифференцированного состояния клеток, а затем резко снижается при появлении в культуре высокого уровня экспрессии мРНК *TUBB3* и нейроноподобных клеток с отростками, окрашенными на β III-тубулин.

Таким образом, проведенное нами исследование показало, что bFGF имеет двойственное влияние на ARPE-19: сначала снижает дифференцировку клеток, а затем направляет их по нейрональному пути развития. Это позволяет предположить, что механизм активации трансдифференцировки в нервные клетки может существовать, по крайней мере частично, в клетках РПЭ человека, и клетки постоянной линии ARPE-19 подходят для изучения этих процессов.

Литература

1. Кузнецова А.В., Милушина Л.А., Микаелян А.С., Зиновьева Р.Д., Григорян Э.Н., Александрова М.А. Дедифференцировка клеток ретинального пигментного эпителия глаза взрослого человека *in vitro* // Мол. мед. 2010. № 6. С. 23-29.
2. Akrami H., Soheili Z.S., Khalooghi K., Ahmadi H., Rezaie-Kanavi M., Samiei S., Davari M., Ghaderi S., Sanie-Jahromi F. Retinal pigment epithelium culture; a potential source of retinal stem cells // J. Ophthalmic Vis. Res. 2009. Vol. 4, N 3. P. 134-141.
3. Azuma N., Tadokoro K., Asaka A., Yamada M., Yamaguchi Y., Handa H., Matsushima S., Watanabe T., Kohsaka S., Kida Y., Shiraishi T., Ogura T., Shimamura K., Nakafuku M. The Pax6 isoform bearing an alternative spliced exon promotes the development of the neural retinal structure // Hum. Mol. Genet. 2005. Vol. 14, N 6. P. 735-745.



4. Bharti K., Nguyen M.T., Skuntz S., Bertuzzi S., Arnheiter H. The other pigment cell: specification and development of the pigmented epithelium of the vertebrate eye // *Pigment Cell Res.* 2006. Vol. 19, N 5. P. 380-394.
5. Carr A.J., Vugler A.A., Yu L., Semo M., Coffey P., Moss S.E., Greenwood J. The expression of retinal cell markers in human retinal pigment epithelial cells and their augmentation by the synthetic retinoid fenretinide // *Mol. Vis.* 2011. Vol. 17. P. 1701-1715.
6. Chen S., Fariss R.N., Kutty R.K., Nelson R., Wiggert B. Fenretinide-induced neuronal differentiation of ARPE-19 human retinal pigment epithelial cells is associated with the differential expression of Hsp70, 14-3-3, pax-6, tubulin beta-III, NSE, and bag-1 proteins // *Mol. Vis.* 2006. Vol. 12. P. 1355-1363.
7. Dunn K.C., Aotaki-Keen A.E., Putkey F.R., Hjelmeland L.M. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties // *Exp. Eye Res.* 1996. Vol. 62, N 2. P. 155-169.
8. Eguizabal C., Montserrat N., Veiga A., Izpisua Belmonte J.C. Dedifferentiation, transdifferentiation, and reprogramming: future directions in regenerative medicine // *Semin. Reprod. Med.* 2013. Vol. 31, N 1. P. 82-94.
9. Fang J., Shaw P.X., Wang Y., Goldberg J.L. Krüppel-Like Factor 4 (KLF4) is not required for retinal cell differentiation // *eNeuro.* 2016. Vol. 3, N 1. pii: ENEURO.0117-15.2016. doi: 10.1523/ENEURO.0117-15.2016.
10. Grigorian E.N. Competence factors of retinal pigment epithelium cells for reprogramming in the neuronal direction during retinal regeneration in newts // *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.* 2015. N 1. P. 5-16.
11. Grigoryan E.N., Markitantova Y.V., Avdonin P.P., Radugina E.A. Study of regeneration in amphibians in age of molecular-genetic approaches and methods // *Genetika.* 2013. Vol. 49, N 1. P. 55-72.
12. Kojima A., Nakahama K., Ohno-Matsui K., Shimada N., Mori K., Iseki S., Sato T., Mochizuki M., Morita I. Connexin 43 contributes to differentiation of retinal pigment epithelial cells via cyclic AMP signaling // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. Vol. 366, N 2. P. 532-538.
13. Kuznetsova A.V., Aleksandrova M.A., Kurinov A.M., Chentsova E.V., Makarov P.V. Plasticity of adult human retinal pigment epithelial cells // *Int. J. Clin. Exp.* 2016. Vol. 9, N 11. P. 20 892-20906.
14. Kuznetsova A.V., Aleksandrova M.A. Heterogeneity of retinal pigment epithelial cells from adult human eye in different culturing systems // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017. Vol. 162, N 4. P. 569-577.
15. Kuznetsova A.V., Kurinov A.M., Aleksandrova M.A. Cell models to study regulation of cell transformation in pathologies of retinal pigment epithelium // *J. Ophthalmol.* 2014. Vol. 2014. ID 801787. doi: 10.1155/2014/801787.
16. 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., Fasano C.A. Sustained levels of FGF2 maintain undifferentiated stem cell cultures with biweekly feeding // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, N 2. P. e56289. doi: 10.1371/journal.pone.0056289.
17. Luz-Madrigal A., Grajales-Esquivel E., McCorkle A., DiLorenzo A.M., Barbosa-Sabanero K., Tsonis P.A., Del Rio-Tsonis K. Reprogramming of the chick retinal pigmented epithelium after retinal injury // *BMC Biol.* 2014. Vol. 12. P. 28. doi: 10.1186/1741-7007-12-28.
18. Martinez-Morales J.R., Del Bene F., Nica G., Hammerschmidt M., Bovolenta P., Wittbrodt J. Differentiation of the vertebrate retina is coordinated by an FGF signaling center // *Dev. Cell.* 2005. Vol. 8, N 4. P. 565-574.
19. Milyushina L.A., Kuznetsova A.V., Grigoryan E.N., Aleksandrova M.A. Phenotypic plasticity of retinal pigment epithelial cells from adult human eye in vitro // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011. Vol. 151, N 4. P. 506-511.
20. Milyushina L.A., Poltavtseva R.A., Marei M.V., Podgornyi O.V., Sukhikh G.T., Aleksandrova M.A. In vitro phenotypic modification of pigmented epithelium cells from human eye at early stages of development // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2009. Vol. 148, N 1. P. 113-119.
21. Milyushina L.A., Verdiev B.I., Kuznetsova A.V., Aleksandrova M.A. Expression of multipotent and retinal markers in pigment epithelium of adult human in vitro // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012. Vol. 153, N 1. P. 157-162.
22. Mochii M., Mazaki Y., Mizuno N., Hayashi H., Eguchi G. Role of Mitf in differentiation and transdifferentiation of chicken pigmented epithelial cell // *Dev. Biol.* 1998. Vol. 193, N 1. P. 47-62.
23. Pittack C., Grunwald G.B., Reh T.A. Fibroblast growth factors are necessary for neural retina but not pigmented epithelium differentiation in chick embryos // *Development.* 1997. Vol. 124, N 4. P. 805-816.
24. Sakaguchi D.S., Janick L.M., Reh T.A. Basic fibroblast growth factor (FGF-2) induced transdifferentiation of retinal pigment epithelium: generation of retinal neurons and glia // *Dev. Dyn.* 1997. Vol. 209, N 4. P. 387-398.
25. Salero E., Blenkinsop T.A., Corneo B., Harris A., Rabin D., Stern J.H., Temple S. Adult human RPE can be activated into a multipotent stem cell that produces mesenchymal derivatives // *Cell Stem Cell.* 2012. Vol. 10, N 1. P. 88-95.
26. Schwegler J.S., Knorz M.C., Akkoyun I., Liesenhoff H. Basic, not acidic fibroblast growth factor stimulates proliferation of cultured human retinal pigment epithelial cells // *Mol. Vis.* 1997. Vol. 3. P. 10.
27. Sparrow J.R., Hicks D., Hamel C.P. The retinal pigment epithelium in health and disease // *Curr. Mol. Med.* 2010. Vol. 10, N 9. P. 802-823.
28. Taranova O.V., Magness S.T., Fagan B.M., Wu Y., Surzenko N., Hutton S.R., Pevny L.H. SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence // *Genes Dev.* 2006. Vol. 20, N 9. P. 1187-1202.
29. Yan R.T., He L., Zhan W., Wang S.Z. Induction of ectopic retina-like tissue by transgenic expression of neurogenin // *PLoS One.* 2015. Vol. 10, N 1. P. e0116171. doi: 10.1371/journal.pone.0116171.
30. Zhao S., Thornquist S.C., Barnstable C.J. In vitro transdifferentiation of embryonic rat retinal pigment epithelium to neural retina // *Brain Res.* 1995. Vol. 677, N 2. P. 300-310.