

**Репрограммирование клеток РПЭ человека кондиционированными средами регенератов сетчатки тритона**

**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*

Пигментный эпителий сетчатки человека (РПЭ) обладает эндогенной способностью к репрограммированию, которая по-разному проявляется среди позвоночных. У хвостатых амфибий клетки РПЭ при повреждении дедифференцируются в уникальные мультипотентные stem-like клетки. Эти клетки способны дифференцироваться в нейроны, фоторецепторы и РПЭ, полностью восстанавливая структуру и функции сетчатки. У взрослых млекопитающих и человека РПЭ при повреждении генерирует фибробластоподобные клетки, нарушающие строение сетчатки и вызывающие нарушения зрения, в том числе полную слепоту. Существуют исследования, показывающие, что кондиционированные среды (КС) и клеточные экстракты регенератов тритона способны стимулировать регенерацию в тканях млекопитающих. Изучение механизмов репрограммирования клеток человека белками и транскрипционными факторами тритона является интересной фундаментальной задачей. Индукция эндогенной способности РПЭ к регенерации сетчатки представляет практический интерес.

Целью данной работы является изучение морфологических и молекулярно-генетических изменений клеток РПЭ человека под влиянием КС регенератов сетчатки тритона.

Работу проводили на клеточной линии РПЭ человека ARPE-19 ("Клеточная линия ARPE-19 депонируется в УНУ "Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований" Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН). Для культивирования использовали среду DMEM/F-12 с добавлением КС регенератов сетчатки тритона в концентрациях 25% и 50%. Результаты оценивали на сроках 24ч, 48ч, 72ч, 120ч. В исследовании использовали методы: МТТ-тест для оценки пролиферации, иммуноцитохимическое окрашивание и RT-PCR для оценки изменения дифференцировки, а также органотипическое роллерное культивирование для получения кондиционированных сред.

Под действием КС часть клеток изменила морфологию на нейроноподобную, часть клеток утратила контакты с пластиком и объединилась в агрегаты. Мы предполагаем, что подобные агрегаты свидетельствуют о дедифференцировке РПЭ. На RT-PCR наблюдалось резкое повышение экспрессии маркеров плюрипотентности *OCT4*, *NANOG*, *KLF4* с последующим повышением маркеров нейральной дифференцировки  *$\beta$ III-TUBULIN*, *Pax6*. Иммуноцитохимическое окрашивание показало, что клетки, имеющие нейроноподобную морфологию, дают положительное окрашивание антителами к  *$\beta$ III-TUBULIN* и не окрашиваются антителами к эпителиальному маркеру Сх-43. Также мы наблюдали большое количество клеток, утративших окрашивание как антителами к нейральной, так и эпителиальной дифференцировки. Наибольшую эффективность в репрограммировании РПЭ показало использование 50% КС.

Таким образом, КС регенератов сетчатки тритона способны воздействовать на клетки РПЭ млекопитающих, вызывая их репрограммирование. При этом сначала происходит дедифференцировка РПЭ, а затем дифференцировка в нейральном направлении и направлении РПЭ.