

РОЛЬ NOTCH-ЗАВИСИМОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ РЕЗИДЕНТНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ В РАЗВИТИИ ЛЕГОЧНОГО ФИБРОЗА

Чистякова И. В.¹, Бакаленко Н. И.¹, Малашичева А. Б.¹,
Атюков М. А.², Петров А. С.²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург,
Россия

² Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение
здравоохранения «Городская многопрофильная больница № 2»,
Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:
Чистякова Ирэна Валерьевна,
ФГБУН Институт цитологии РАН,
Тихорецкий пр., д. 4, Санкт-Петербург,
Россия, 194064.
E-mail: itjereina7@gmail.com

Статья поступила в редакцию 10.10.2022
и принята к печати 27.10.2022.

Резюме

Актуальность. На сегодняшний день молекулярные механизмы развития фиброза легких слабо изучены. Известно, что ключевую роль в этом заболевании играет дифференцировка резидентных легочных клеток в миофибробласты. Поиск факторов, способных регулировать такую дифференцировку, представляется актуальной задачей. **Цель.** Оценить влияние активации сигнального пути Notch на резидентные легочные фибробласты путем введения внутриклеточных доменов каждого из 4 Notch-рецепторов (N1-4ICD). **Материалы и методы.** В работе использовали первичные культуры легочных фибробластов от доноров (n = 4) без системных заболеваний и заболеваний легких, бронхов, полученные в результате частичной резекции легочной ткани. Notch-зависимую активацию фибробластов осуществляли путем введения лентивирусных векторов, не несущих и несущих последовательности доменов N1-4ICD. Спустя 8 дней проводили иммуноцитохимическое окрашивание и оценивали относительные уровни экспрессии генов *PDPN*, *HOPX*, *SLUG*, *SNAIL*, *ACTA2* методом количественной ПЦР. **Результаты.** Активация сигнального пути Notch лентивирусными векторами с N1-4ICD приводила к усилению экспрессии *SLUG*, *SNAIL* и *ACTA2*. Наиболее выраженный эффект при этом отмечается при введении лентивирусных частиц, содержащих Notch4-активирующую последовательность. Индуцирование сигналинга путем введения активирующих компонентов N1-3ICD способствовало повышению экспрессии *PDPN*, при введении N4ICD отмечалось усиление уровня экспрессии *HOPX*. **Заключение.** Активация каждого из 4 внутриклеточных доменов рецепторов Notch способна запускать дифференцировку резидентных альвеолярных фибробластов в миофибробласты, которые являются ключевыми участниками развития легочного фиброза.

Ключевые слова: дифференцировка, легочный фиброз, миофибробласты, фибробласты, Notch.

Для цитирования: Чистякова И.В., Бакаленко Н.И., Малашичева А.Б., Атюков М.А., Петров А.С. Роль Notch-зависимой дифференцировки резидентных фибробластов в развитии легочного фиброза. Трансляционная медицина. 2022;9(5):96-104. DOI: 10.18705/2311-4495-2022-9-5-96-104.

THE ROLE OF NOTCH-DEPENDENT DIFFERENTIATION OF RESIDENT FIBROBLASTS IN THE DEVELOPMENT OF PULMONARY FIBROSIS

Irena V. Chistyakova¹, Nadezhda I. Bakalenko¹,
Anna B. Malashicheva¹, Mikhail A. Atyukov², Andrey S. Petrov²

¹ Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² City Multidisciplinary Hospital No. 2, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Irena V. Chistyakova,
Institute of Cytology of the Russian Academy
of Sciences,
Tikhoretsky Avenue, d. 4, Saint Petersburg,
Russia, 194064.
E-mail: itjeren7@gmail.com

Received 10 October 2022; accepted
27 October 2022.

Abstract

Background. Molecular mechanisms of the development of pulmonary fibrosis are poorly understood. It is known that differentiation of resident lung cells into myofibroblasts plays a key role in this disease. The search for factors capable of regulating such differentiation is an urgent task. **Objective.** To evaluate the effect of Notch signaling pathway activation on resident lung fibroblasts by introducing the intracellular domains of each of the 4 Notch receptors (N1-4ICD). **Design and methods.** Primary cultures of pulmonary fibroblasts from donors (n = 4) were used. Notch-dependent activation of fibroblasts was carried out by introducing lentiviral vectors with/without sequences of N1-4ICD domains. After 8 days, immunocytochemical staining was performed and the relative expression levels of the *PDPN*, *HOPX*, *SLUG*, *SNAIL* and *ACTA2* genes were evaluated by qPCR. **Results.** Activation of the Notch signaling pathway by N1-4ICD resulted in increased expression of *SLUG*, *SNAIL* and *ACTA2*. The most pronounced effect was observed with the introduction of Notch4-activating sequence. Induction of signaling by the introduction of N1-3ICD activating components contributed to an increase in *PDPN* expression, with the introduction of N4ICD, an increase in the level of *HOPX* expression was noted. **Conclusion.** Activation of each of the 4 intracellular Notch receptor domains is able to trigger the differentiation of resident alveolar fibroblasts into myofibroblasts, which are key players in the development of pulmonary fibrosis.

Key words: differentiation, fibroblasts, myofibroblasts, Notch, pulmonary fibrosis.

For citation: Chistyakova IV, Bakalenko NI, Malashicheva AB, Atyukov MA, Petrov AS. The role of Notch-dependent differentiation of resident fibroblasts in the development of pulmonary fibrosis. Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine. 2022;9(5):96-104. (In Russ.) DOI: 10.18705/2311-4495-2022-9-5-96-104.

Список сокращений: ВКМ — внутриклеточный матрикс, ВСБ — водно-солевой буфер, кДНК — кодирующая дезоксирибонуклеиновая кислота, ПЦР — полимеразная цепная реакция, РНК — рибонуклеиновая кислота, ФБС — фетальная бычья сыворотка, ФСБ — фосфатно-солевой буфер, ЭМП — эпителиально-мезенхимный переход, *ACTA2* — ген, кодирующий актин альфа 2, *AQP5* — ген, кодирующий аквапорин 5, *CDH1* — ген, кодирующий е-кадгерин, *COL1A1* — ген, кодирующий коллаген 1 типа, DAPI — 4',6-диамидино-2-фенилиндолил, НЕК — почка эмбриона человека, *HOPX* — ген, кодирующий гомеодоменный белок, MMLV-RT — обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей, NF-κB — транскрипционный ядерный фактор, *PDPN* — ген, кодирующий подопланин, *SNAIL* и *SLUG* — гены, кодирующие транскрипционные факторы, *SP-C* — ген, кодирующий сурфактантный белок С, TGFβ — трансформирующий фактор роста β, *VIM* — ген,

кодирующий виментин, α -SMA — гладкомышечный актин.

Введение

Фиброз легких — это патологическое состояние, которое характеризуется чрезмерным разрастанием соединительной ткани, избыточным отложением внеклеточного матрикса (ВКМ), что приводит к необратимому ремоделированию легочной ткани и нарушению дыхательной функции. Важным фактором развития фиброза является накопление в тканях легкого миофибробластов. Миофибробласты синтезируют большое количество ВКМ и продуцируют фиброгенные цитокины [1]. Клеточные источники миофибробластов при фиброзе легких до конца не установлены. В различных исследованиях было показано, что миофибробласты могут происходить от клеток стромы легкого, включая резидентные фибробласты и перициты, из мезенхимных стволовых клеток костного мозга, а также путем трансдифференцировки альвеолярных эпителиальных клеток [2].

Молекулярные механизмы, приводящие к развитию легочного фиброза, изучены слабо. Известно, что сигнальные пути, которые регулируют развитие легких, активируются также у взрослых при восстановлении повреждений. Однако хроническая их активация нередко приводит к различным патологиям легких. Сигнальный путь Notch играет важную роль в развитии легких, в частности, он связан с регуляцией эпителиально-мезенхимных взаимодействий в ходе альвеологенеза, участвует в поддержании целостности эпителиального и гладкомышечного слоев дистальных проводящих дыхательных путей в развивающемся легком. Известно также, что многие компоненты сигнального пути Notch активируются у взрослых пациентов с различными заболеваниями легких. Последние десятилетия накапливаются данные о роли сигнального пути Notch в развитии легочного фиброза. У млекопитающих описано 4 рецептора сигнального пути Notch (Notch1-4). К настоящему моменту их участие в развитии фиброза изучено в разной степени. Было показано, что активация Notch1 приводит к миофибробластной дифференцировке альвеолярных эпителиальных клеток [2], перицитов [3], мышечных легочных фибробластов [1]. В этих клетках растет уровень экспрессии генов эпителиально-мезенхимного перехода (ЭМП) *SLUG* и *SNAIL* и основного маркера миофибробластов *ACTA2*. На животных моделях фиброза легких было показано, что дефицит Notch1 или Notch3 существенно уменьшает количество миофибробластов и в значительной степени предотвращает

фиброзное изменение легочной ткани [4, 5]. Данные о роли Notch2 и Notch4 в развитии легочного фиброза практически нет.

Цель нашей работы — оценить влияние активации сигнального пути Notch на резидентные легочные фибробласты путем введения внутриклеточных доменов каждого из 4 Notch рецепторов (N1-4ICD).

Материалы и методы

В работе использовали первичные культуры легочных фибробластов от доноров ($n = 4$) без системных заболеваний и заболеваний легких, бронхов, полученные в результате частичной резекции легочной ткани. Протоколы исследований были утверждены локальным комитетом по этике СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2» и соответствовали принципам Хельсинкской декларации. У всех пациентов было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании и биопсию ткани. Средний возраст доноров составлял 29 ± 8 лет.

Получение и культивирование фибробластов легких. После резекции фрагменты легкого помещали в стерильную пробирку, содержащую фосфатно-солевой буфер (ФСБ), 40 мкг гентамицина, и транспортировали в лабораторию. В стерильных условиях у легочных эксплантов удаляли интерстициальную оболочку. После промывания в ФСБ фрагменты ткани инкубировали в течение 0,5–1,5 часов при 37°C с 0,1 % раствором коллагеназы (коллагеназа типа II, 100 ед/мл, Worthington Biochemical Corporation, США). Затем полученную суспензию процеживали через сито с диаметром поры 40 мкм и отмывали от форменных элементов путем центрифугирования в течение 5 минут при 300 g. Осадок, содержащий легочные клетки, дважды промывали модифицированной по Дюльбекко средой Игла F12 (DMEM/F12) с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС, NuClone, США). Легочные клетки высевали на культуральные фласки площадью 25 см^2 в коммерческую среду Human Lung fibroblast medium с добавлением коктейля ростовых факторов, 2 mM L-глутамин и 50 мкг/мл гентамицина. Условия культивирования стандартные — температура 37°C с 5 % содержанием CO_2 . На следующий день клетки промывали в ФСБ с добавлением 40 мкг/мл гентамицина и меняли культуральную среду. Чистую культуру фибробластов получали путем дифференциальной трепсинизации 0,05 % раствором трипсина. Морфологическую оценку клеточной популяции производили с помощью инвертированного микроскопа Leica DMil (Leica,

США) при увеличении 20×. В экспериментах использовали фибробласты 2–3 пассажа.

Лентивирусная трансдукция фибробластов. При создании лентивирусных частиц использовали протокол, разработанный в лаборатории Д. Троне и модифицированный в нашей лаборатории [6]. Нарботка лентивирусных частиц, не несущих и несущих последовательности доменов N1-4ICD, осуществлялась в клетках линии HEK293-T. Notch-зависимую активацию фибробластов осуществляли путем введения лентивирусного вектора с использованием полиэтиленэмина (Sigma-Aldrich, США). Плотность трансдуцируемых клеток составляла 6×10^4 клеток/мл. После трансдукции легочные фибробласты культивировали в течение 8 дней.

Выделение РНК и ПЦР в реальном времени. Общую РНК выделяли при помощи реагента Тризол («Евроген», Россия) в соответствии с инструкциями производителя. кДНК синтезировали при помощи random primer и набора MMLV RT («Евроген», Россия). Количественный анализ уровня экспрессии исследуемых генов проводили с использованием коммерческих систем ПЦР в реальном времени SYBR Green («Евроген», Россия) при следующих условиях термоциклирования: 95 °C в течение 5 минут, денатурация при 95 °C в течение 15 секунд и отжиг праймеров с амплификацией 60 секунд при 60 °C. Относительные уровни экспрессии генов ЭПМ (*SNAIL*, *SLUG*), миофибробластов (α -SMA), эпителиальных клеток (*PDPN*, *HOPX*) анализировали при помощи сравнительного метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$. При проведении ПЦР осуществляли 3 технических повтора.

Иммуноцитохимическое окрашивание. Клетки, предназначенные для иммунофенотипирования, культивировали на покровных стеклах в течение 8 дней, далее фиксировали в течение 20 минут в 4 % параформальдегиде. После фиксации фибробласты пермеабелизировали 0,1 % раствором Тритона X-100 в течение 10 минут и промывали ФСБ с последующим блокированием в 1 % BSA в течение 1 часа. Инкубацию клеток с первичными антителами к α -SMA (1:250, NB300-978, Novus, США), Podoplanin (1:250, EPR22182, Abcam, Великобритания), HOP (1:250, E-1, Santa Cruz, США) проводили во влажной камере в течение 1 часа при комнатной температуре. Далее клетки трижды промывали в ФСБ в течение 5 минут и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с Alexa488 и Alexa546 (Invitrogen, США). Отмытые в ФСБ клетки окрашивали раствором DAPI (0,2 мкг/мл, Invitrogen, США) в течение 3 минут. Стекла с клетками трижды промывали в ФСБ и монтировали с помощью Fluoramount. Визу-

ализацию и анализ проводили с помощью конфокального микроскопа Olympus FV3000 (Olympus Corporation, Япония) при увеличении 40× и соответствующего программного обеспечения.

Статистическая обработка. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ STATISTICA 10.0 и GraphPad Prism 9.0. При сравнении двух независимых выборок применяли непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения ($M \pm SD$).

Результаты

В норме альвеолярные фибробласты обеспечивают процессы регенерации при действии повреждающих факторов. Однако при патологической активации фибробласты способны дифференцироваться в миофибробласты, приводя к развитию фиброза. При оценке изучаемой культуры было выявлено, что клеточная популяция экспрессирует ряд генов, характерных для легочных резидентных альвеолярных фибробластов (*PDPN*, *VIM*, *COL1A1*) [7]. При этом наши культуры не экспрессировали как маркеры эпителиальных легочных клеток (*CDH1*, *AQP5*, *SP-C*), так и маркер миофибробластной дифференцировки *ACTA2*. Для анализа влияния сигнального пути Notch на миофибробластный потенциал полученной культуры мы заразили альвеолярные фибробласты лентивирусными частицами, несущими последовательности, кодирующие внутриклеточные домены рецепторов NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 и NOTCH4 — N1ICD, N2ICD, N3ICD, N4ICD.

В результате иммунофенотипирования легочных фибробластов, трансдуцированных N1ICD, N2ICD, N3ICD, N4ICD, наблюдали видимое увеличение содержания эпителиального маркера PDPN, а также появления HOP — белка, участвующего в созревании эпителиальных легочных клеток II типа, и маркера миофибробластов — гладкомышечного актина (α -SMA) по сравнению с контрольной группой (рис. 1). При трансдукции лентивирусными частицами, не содержащими последовательностей Notch, изменений в интенсивности флуоресценции не наблюдалось.

Для того чтобы подтвердить наблюдаемые изменения, мы проанализировали экспрессию *PDPN*, *HOPX* (гена, кодирующего HOP), *ACTA2* (гена, кодирующего α -SMA) методом количественной ПЦР (рис. 2). Нами было установлено, что Notch-зависимая индукция способствует усилению экспрессии вышеуказанных генов, что согласуется с данными, полученными при иммуноцитохимическом окрашивании. Важно отметить, что вирусная трансдукция

различными NICD вызывает различные биологические клеточные ответы. Введение внутриклеточных доменов N1ICD, N2ICD, N3ICD опосредует достоверное повышение уровня содержания PDPN по сравнению с контрольной группой клеток и клетками, трансдуцированными N4ICD. При оценке экспрессии *HOPX* достоверное повышение отмечали у клеток, инфицированных N4ICD, относительно контрольной группы фибробластов.

В дальнейшем мы оценили относительные уровни экспрессии генов эпителиально-мезенхимного перехода (*SLUG*, *SNAIL*) и маркера миофибробластных клеток (*ACTA2*) (рис. 2). В результате проведенного анализа было отмечено, что индукция Notch-сигналинга (N1ICD, N2ICD, N3ICD, N4ICD) приводит к активации экспрессии генов мезенхимной дифференцировки. При этом наиболее выраженный эффект наблюдался в клетках, зараженных лентивирусной конструкцией с N4ICD. Важно отметить, что при заражении вирусным вектором, не несущим активирующие последовательности Notch (pCIG), изменений уровней экспрессии всех изучаемых генов относительно контрольной группы отмечено не было.

Таким образом, мы обнаружили, что активация сигнального пути Notch путем лентивирусной

трансдукции последовательностей внутриклеточных доменов (N1ICD, N2ICD, N3ICD, N4ICD) приводила к усилению экспрессии *SLUG*, *SNAIL* и *ACTA2* (α -SMA). Наиболее выраженный эффект при этом отмечается при введении лентивирусного вектора, содержащего активирующую Notch4 последовательность. Индуцирование сигналинга путем введения активирующих компонентов N1ICD, N2ICD, N3ICD способствовало повышению экспрессии *PDPN*, при введении N4ICD отмечалось усиление уровня экспрессии *HOPX*.

Обсуждение

Notch-сигналинг и ЭМП. Эпителиально-мезенхимный переход приводит к изменению клетками эпителиального фенотипа на мезенхимный. ЭМП важен в эмбриональном развитии и процессах регенерации, но также задействован во многих патологических процессах. В частности, ЭМП ассоциирован с хроническим фиброзом почек, легких, печени и сердца [4]. На молекулярном уровне ЭМП запускается рядом транскрипционных факторов (*SNAIL*, *SLUG*, *TWIST*, *LEF-1* и др.), характеризуется потерей экспрессии маркеров, отвечающих за формирование плотных клеточных контактов (*E-Cadherin*, *occludin*) [8]. Ряд исследо-

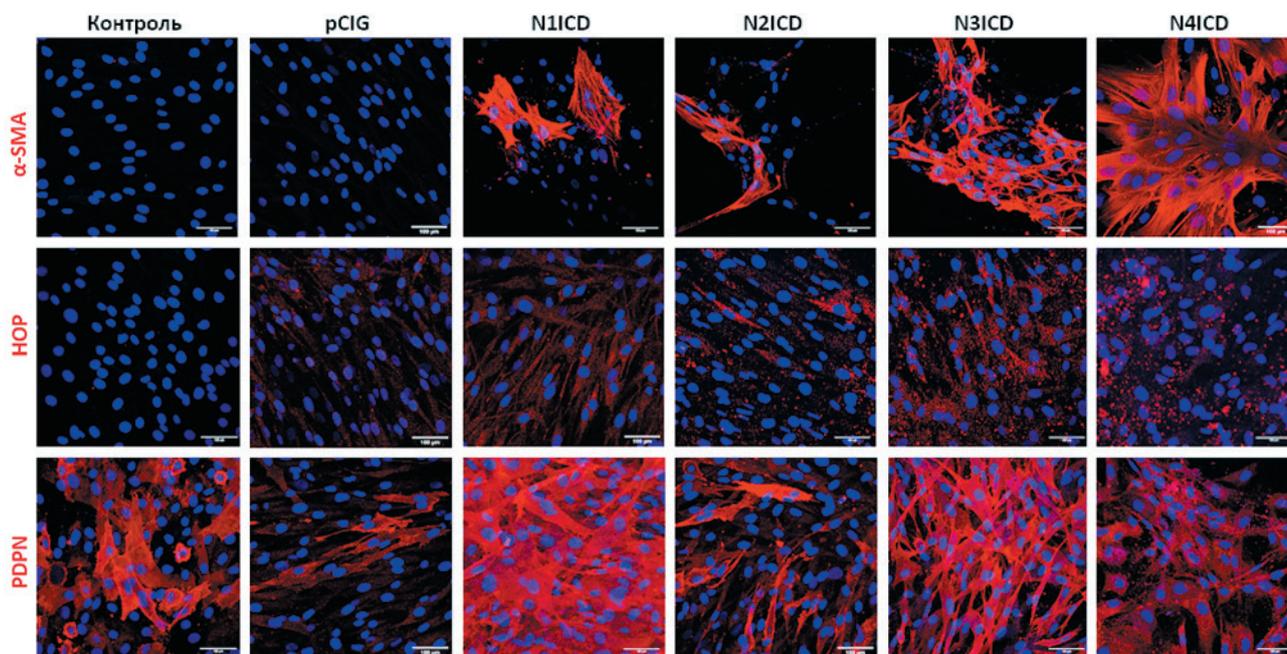


Рис. 1. Иммуноцитохимическое окрашивание легочных фибробластов, трансдуцированных контрольным pCIG вектором и лентивирусными частицами, несущими активирующие компоненты Notch (N1ICD, N2ICD, N3ICD, N4ICD)

Figure 1. Immunocytochemical staining of lung fibroblasts transduced with control pCIG vector and lentiviral particles containing Notch activating components (N1ICD, N2ICD, N3ICD, N4ICD)

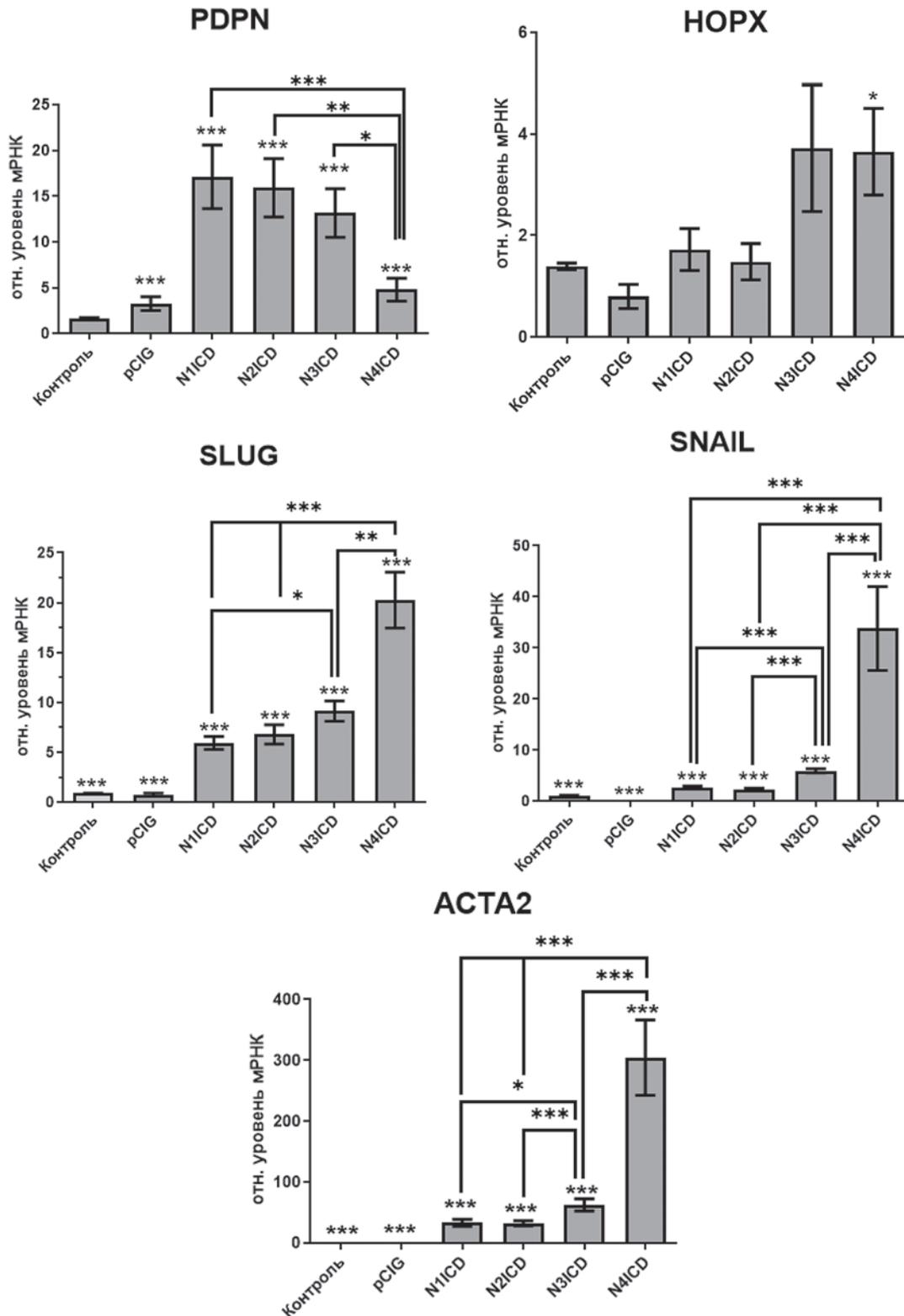


Рис. 2. Влияние активации Notch-рецепторов на паттерны экспрессии генов эпителиальных клеток (PDPN, HOPX), эпителиально-мезенхимного перехода (SLUG, SNAIL) и миофибробластов (ACTA2). Достоверность сравниваемых значений (U-критерий Манна-Уитни при нормальном распределении, $M \pm SD$): *** — $P < 0,001$; ** — $P < 0,01$; * — $P < 0,05$

Figure 2. Influence of Notch receptor activation on epithelial cell (PDPN, HOPX), epithelial-mesenchymal transition (SLUG, SNAIL), and myofibroblast (ACTA2) gene expression patterns. Statistical significance of compared values (Mann-Whitney U-test with normal distribution, $M \pm SD$): *** — $P < 0.001$; ** — $P < 0.01$; * — $P < 0.05$

ваний указывает на роль сигнального пути Notch в ЭМП. В частности, было показано, что активация внутриклеточного домена Notch в клетках эпителиальной альвеолярной клеточной линии крысы RLE-6TN приводит к потере этими клетками эпителиальных маркеров, экспрессии генов ЭМП и приобретению мезенхимного фенотипа [2]. Кроме того, факторы Notch могут регулировать ЭМП опосредованно через другие сигнальные пути, включая TGF β [2], NF- κ B [9] и β -catenin [10]. Наши культуры резидентных альвеолярных фибробластов не эпителиальные, однако активация каждого из доменов Notch (N1-4ICD) приводит к значительному усилению экспрессии ключевых генов ЭМП *SNAIL* и *SLUG*, что, по-видимому, указывает на усиление мезенхимной дифференцировки.

Notch-сигналинг и дифференцировка миофибробластов. Накопление миофибробластов является одним из ключевых факторов развития фиброза. Эти клетки характеризуются присутствием гладкомышечного альфа-актина (α -SMA), который кодируется геном *ACTA2*. Множество исследований указывают на участие сигнального пути Notch в дифференцировке миофибробластов при фиброзных изменениях различных органов и тканей [4]. Однако влияние сигнального пути Notch на дифференцировку клеток легких в миофибробласты описано только для Notch1. Показано, что экзогенный N1ICD вызывает дифференцировку эпителиальных легочных клеток крысы [2], легочных перидитов мыши [3], легочных фибробластов мыши [1] в миофибробласты. Также ряд исследований указывает на роль Notch3 в дифференцировке миофибробластов и развитии фиброза легких [5, 11]. Наша работа показывает, что все 4 Notch-рецептора способствуют миофибробластной дифференцировке клеток культуры альвеолярных фибробластов человека. Внутриклеточные домены всех 4 рецепторов запускают экспрессию гена *ACTA2*. Уровень его экспрессии особенно высок в клетках, трансдуцированных N4ICD.

Влияние активации **Notch-сигналинга на экспрессию PDPN и HOPX.** Подоплатин (PDPN) — трансмембранный белок, экспрессирующийся во многих тканях. PDPN обнаруживается в подоцитах почек, лимфатических эндотелиальных клетках, клетках тимуса, кератиноцитах кожи, дендритных клетках. Кроме того, это один из первых описанных молекулярных маркеров альвеолярных эпителиальных клеток I типа [12]. Мы обнаружили, что в культуре альвеолярных фибробластов PDPN экспрессируется слабо. Однако активация внутриклеточных доменов рецепторов NOTCH1, NOTCH2 и NOTCH3 (но не NOTCH4) приводит

к заметному увеличению уровня его экспрессии. Этот результат выглядит неожиданным, если рассматривать PDPN только как маркер альвеолярных эпителиальных клеток. Многочисленные исследования показывают, что функции этого белка очень разнообразны. Например, PDPN участвует в ЭМП и способствует миграции клеток как в норме (ЭМП клеток эпикардия при развитии сердца, миграция дендритных клеток в лимфатические узлы), так и при росте опухолей, что приводит к усилению метастазов [12]. Возможно, в контексте миофибробластной дифференцировки легочных клеток PDPN является одним из эффекторов сигнального пути Notch, опосредующих его участие в ЭМП и увеличении подвижности клеток.

HOPX участвует в развитии легких, в частности способствует созреванию альвеолярных эпителиальных клеток 2 типа [13]. Уровень его экспрессии очень низок в легочных фибробластах, индукция Notch сигналинга практически не влияет на уровень его экспрессии. N4ICD вызывает незначительное усиление экспрессии *HOPX*.

Notch4 — новый фактор развития легочного фиброза? Наше исследование, с одной стороны, показало, что все 4 рецептора Notch способствуют усилению мезенхимного фенотипа и индуцируют миофибробластную дифференцировку, а с другой стороны — выявило определенную специфичность клеточного ответа на введение различных NICD. Трансдукция альвеолярных фибробластов N1ICD, N2ICD, N3ICD приводит к схожим изменениям по всем исследованным генам (*SLUG*, *SNAIL*, *ACTA2*, *PDPN*, *HOPX*), хотя в ряде случаев отмечаются достоверные различия в уровнях экспрессии. В клетках же, трансдуцированных N4ICD, уровень экспрессии всех этих генов достоверно отличается от клеток, трансдуцированных другими NICD. Интересно, что характерные профиброзные гены (*SNAIL*, *SLUG*, *ACTA2*) под влиянием N4ICD экспрессируются значительно сильнее. До сих пор какое-либо участие Notch4 в развитии фиброза легких не было показано. Практически нет данных и о роли этого Notch-рецептора в фиброзных изменениях других органов и тканей. Известно только, что при фиброзе печени у крыс количество клеток, экспрессирующих Notch4, возрастает (наряду с Notch1 и Notch3) [14]. Показанная нами способность N4ICD столь значительно активировать профиброзные маркеры означает, что Notch4 может оказаться одним из ключевых факторов развития фиброза легких. Интересно также, что, в отличие от NOTCH1-3, NOTCH4 практически не усиливает экспрессию *PDPN*, и при этом единственный из всех незначительно активирует экспрессию *HOPX*. Это может означать, что влияние

NOTCH4 на миофибробластную дифференцировку легочных фибробластов человека может осуществляться через иные сигнальные пути, чем у остальных рецепторов Notch.

Заключение

Активация сигнального пути Notch путем введения лентивирусных векторов, содержащих кодирующие последовательности внутриклеточных доменов (N1ICD, N2ICD, N3ICD, N4ICD), приводит к усилению экспрессии генов мезенхимной дифференцировки *SLUG*, *SNAIL* и *ACTA2* (α -SMA). При этом самый высокий уровень экспрессии наблюдался в фибробластах, трансдуцированных лентивирусной конструкцией с N4ICD. Индукция сигнального пути Notch посредством введения N1ICD, N2ICD, N3ICD способствует повышению экспрессии *PDPN*, при заражении вектором, содержащим кодирующий участок для N4ICD, отмечалось незначительное усиление относительного уровня экспрессии *HOPX*. Полученные нами результаты показывают, что активация каждого из 4 внутриклеточных доменов рецепторов Notch способна запускать дифференцировку резидентных альвеолярных фибробластов в миофибробласты. Эти данные расширяют наши представления о значительной роли сигнального пути Notch в развитии легочного фиброза.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Благодарности / Acknowledgments

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации и Российской академии наук (соглашение № 075-15-2021-1075). / The study was carried out with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation and the Russian Academy of Sciences (Agreement No. 075-15-2021-1075).

Список литературы / References

1. Liu T, Hu B, Choi YY, et al. Notch1 signaling in FIZZ1 induction of myofibroblast differentiation. *Am J Pathol.* 2009; 174(5):1745–1755. DOI: 10.2353/ajpath.2009.080618.
2. Aoyagi-Ikeda K, Maeno T, Matsui H, et al. Notch induces myofibroblast differentiation of alveolar epithelial cells via transforming growth factor- β -Smad3 pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011; 45(1):136–144. DOI: 10.1165/rcmb.2010-0140oc.

3. Wang YC, Chen Q, Luo JM, et al. Notch1 promotes the pericyte-myofibroblast transition in idiopathic pulmonary fibrosis through the PDGFR/ROCK1 signal pathway. *Exp Mol Med.* 2019; 51(3):1–11. DOI: 10.1038/s12276-019-0228-0.

4. Hu B, Phan SH. Notch in fibrosis and as a target of anti-fibrotic therapy. *Pharmacol Res.* 2016; 108:57–64. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.04.010.

5. Vera L, Garcia-Olloqui P, Petri E, et al. Notch3 Deficiency Attenuates Pulmonary Fibrosis and Impedes Lung-Function Decline. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2021; 64(4):465–476. DOI: 10.1165/rcmb.2020-0516OC.

6. Canalis E. Notch signaling in osteoblasts. *Sci Signal.* 2008; 1(17):pe17. DOI: 10.1126/stke.117pe17.

7. Barron L, Gharib SA, Duffield JS. Lung Pericytes and Resident Fibroblasts: Busy Multitaskers. *Am J Pathol.* 2016; 186(10):2519–2531. DOI: 10.1016/j.ajpath.2016.07.004.

8. Horowitz JC, Thannickal VJ. Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2006; 27(6):600–612. DOI: 10.1055/s-2006-957332.

9. Gopalakrishnan N, Sivasithamparam ND, Devaraj H. Synergistic association of Notch and NF κ B signaling and role of Notch signaling in modulating epithelial to mesenchymal transition in colorectal adenocarcinoma. *Biochimie.* 2014; 107 Pt B:310–318. DOI: 10.1016/j.biochi.2014.09.020.

10. Leong KG, Niessen K, Kulic I, et al. Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. *J Exp Med.* 2007; 204(12):2935–2948. DOI: 10.1084/jem.20071082.

11. Gajjala PR, Madala SK. Notch3: A New Culprit in Fibrotic Lung Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2021; 64(4):403–404. DOI: 10.1165/rcmb.2021-0024ED.

12. Astarita JL, Acton SE, Turley SJ. Podoplanin: emerging functions in development, the immune system, and cancer. *Front Immunol.* 2012; 3:283. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00283.

13. Liu Y, Zhang W. The role of HOPX in normal tissues and tumor progression. *Biosci Rep.* 2020; 40(1):BSR20191953. DOI: 10.1042/BSR20191953.

14. Tanriverdi G, Kaya-Dagistanli F, Ayla S, et al. Resveratrol can prevent CCl₄-induced liver injury by inhibiting Notch signaling pathway. *Histol Histopathol.* 2016; 31(7):769–784. DOI: 10.14670/HH-11-720.

Информация об авторах:

Чистякова Ирэна Валерьевна, к.б.н., научный сотрудник лаборатории регенеративной биомедицины, ФГБУН Институт цитологии РАН;

Бакаленко Надежда Игоревна, к.б.н., научный сотрудник лаборатории регенеративной биомедицины, ФГБУН Институт цитологии РАН;

Малашичева Анна Борисовна, д.б.н., заведующий лабораторией регенеративной биомедицины, ФГБУН Институт цитологии РАН;

Атюков Михаил Александрович, к.м.н., заведующий отделением торакальной хирургии, СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2»;

Петров Андрей Сергеевич, к.м.н., торакальный хирург, СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница № 2».

Author information:

Irena V. Chistyakova, Ph.D., Researcher, Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology;

Nadezhda I. Bakalenko, Ph.D., Researcher, Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology;

Anna B. Malashicheva, D.Sci., Head of the Laboratory of Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology;

Mikhail A. Atyukov, Ph.D., Head of Thoracic surgery department, City Multidisciplinary Hospital No. 2;

Andrey S. Petrov, Ph.D., thoracic surgeon, City Multidisciplinary Hospital No. 2.