КОНТАКТ ЭНДОТЕЛИЯ С ВНЕКЛЕТОЧНЫМ МАТРИКСОМ, РЕМОДЕЛИРОВАННЫМ ПРИ РАЗВИТИИ ФИБРОЗА, НЕ АКТИВИРУЕТ СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ TGFβ

Виговский М.А., Дьячкова У.Д., Басалова Н.А., Александрушкина Н.А., Новоселецкая Е.С., Кулебякина М.А., Зайцев И.Л., Попов В.С.,   
Ефименко А.Ю., Григорьева О.А.

Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**Введение.** Проблема фиброзирования тканей при ранозаживлении остается нерешенной в регенеративной медицине. При данной патологии, миофибробласты, источниками которых могут быть резидентные интерстициальные фибробласты, циркулирующие фиброциты из периферической крови, а также мезенхимные предшественники, образованные в результате эпителиально-мезенхимного (ЭМТ) и эндотелиально-мезенхимного (эндоМТ) переходов, синтезируют избыточное количество внеклеточного матрикса, что приводит к постепенной утрате функций легкого.

Основным профиброгенным фактором роста, индуцирующим дифференцировку миофибробластов, является трансформирующий фактор роста бета (TGFβ-1), который активирует канонические сигнальные каскады, (приводит к транскрипции генов,   
EDA-фибронектина, коллагена I типа и факторов транскрипции Snai1, Slug/Snai2, Twist, стимулирующих экспрессию генов при эндоМТ) и неканонические каскады: MAPK, ERK, AKT. В результате их активации клеточными ответами могут быть миграция, пролиферация или повышение выживаемости клеток.

Жесткость и изменение состава матрикса, наряду с действием TGFβ, является доказанным стимулом, индуцирующим признаки эндоМТ в эндотелиоцитах [1,2]. Ранее нами была разработана модель влияния профибротического и нормального ВКМ, продуцируемого фибробластами легких, на стимуляцию эндоМТ в клетках эндотелия.   
С использованием этой модели мы показали, что культивирование при контакте с профибротическим матриксом значительно повышает экспрессию генов Snai1 и Slug/Snai2 в эндотелиоцитах по сравнению с культивированием на нормальном матриксе. В данной работе мы проанализировали активацию сигнальных путей в эндотелиоцитах при контакте с ВКМ и стимуляции TGFβ.

**Материалы и методы. *Клеточные культуры.*** Первичная линия клеток эндотелия вены пупочного канатика человека (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) была получена из биобанка ИРМ МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова. После разморозки линию вели на пластике, покрытом желатином в полной среде роста EGM-2 (Endothelial Growth Medium, with FBS and supplements, Lonza, Швейцария) с добавлением 1% пенициллина/стрептомицина (Gibco, США). Фибробласты легких выделяли из легких здоровых мышей, либо мышей с легочным фиброзом, индуцированным блеомицином по описанной методике [3]. Легочные фибробласты культивировали в полной ростовой среде с добавлением 1% GlutaMAX-1 (Gibco, США). Все клеточные линии культивировали в CO2-инкубаторе при 37°C и 5% содержании CO2. Культуральную среду меняли на свежую каждые 3 дня. При достижении 80% конфлюентности монослоя клетки пассировали в соотношении 1:4.

Дизайн эксперимента предполагал получение трех образцов на нормальном, фиброзном матриксах, либо желатине в качестве контроля. Точка 0 – клетки HUVEC, лизированные в процессе пассирования, вскоре после снятия клеток с чашек (далее обозначается как контроль, К). Точка 1 – через 2 часа с момента прикрепления клеток к матриксам. Затем, через 24 часа в среде EGM2 клеткам добавляли рекомбинантный человеческий TGFβ-1 (Cell Signaling, США), разведенный в полной среде роста до рабочей концентрации 5 нг/мл, либо в качестве контроля добавляли равный объем полной среды роста без фактора. Инкубировали клетки в течение 1 часа, после чего клетки отмывали и лизировали.

***Подготовка дВКМ легочных фибробластов.*** Фибробласты высевали на чашки с плотностью 50000 кл/мл и культивировали в течение 2 недель для формирования клеточных пластов. Для удаления клеточных компонентов полученные клеточные пласты обрабатывали детергентами – 0.5% 3-[(3-холамидопропил) диметиламмонио]-1-пропансульфонат (CHAPS), растворенного в ФСБ, промывали 3-5 раз стерильным сбалансированным солевым раствором Хэнкса (HBSS) (ПанЭко, Россия) инкубировали с ДНКазой I (50 ед/мл, SciStore, Россия) при 37°С в течение 30 мин. Полученные децеллюляризованные структуры промывали раствором Хэнкса и высушивали в условиях стерильного ламинарного бокса.

***Электрофорез белков и иммуноблоттинг.*** Клетки HUVEC промывали ФСБ, после чего лизировали на льду в 100 мкл 2х Лемли-буфера. Белки лизата клеток разделяли в денатурирующих условиях в присутствии 20% SDS при помощи электрофореза при постоянном напряжении 140 В. Осуществляли перенос белков на PVDF мембрану. Для блокирования неспецифического связывания антител мембрану инкубировали в TBS/Tween, содержащем 5% бычьего сывороточного альбумина на протяжении 40 минут при комнатной температуре. Иммуноблоттинг проводили с использованием неконъюгированных поликлональных кроличьих антител на протяжении ночи при +4°С и последующей инкубацией со вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена в течение 60 минут при комнатной температуре. Для контроля эквивалентности нанесения белка на гель проводили нормирование на тотальный белок и иммуноблоттинг с антителами к GAPDH или к винкулину.

Визуализацию белков, связавшихся с антителами, осуществляли с помощью хемилюминесцентного субстрата. Детекцию хемилюминисценции проводили при помощи ChemiDoc Imaging System (BioRad, США), денситометрический анализ полученных изображений проводили с использованием программы Image Lab (BioRad, США).

***Статистическая обработка****.* Статистическую обработку данных проводили с использованием программы MedCalc v19.7.4 (Belgium). Для проверки достоверности отличий в численных данных между опытными и контрольными группами в связи с малым объемом выборок применяли непараметрический критерий Манна-Уитни или непараметрический критерий Уилкоксона для парных сравнений. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости p <0,05.

**Результаты. *Морфология эндотелиальных клеток.*** Ранее мы показали, что морфология эндотелиальных клеток и состав секретируемых ими компонентов матрикса значительно изменялся после четырех дней культивирования на нормальном и фиброзном дВКМ [4]. Через 24 часа культивирования, существенных морфологических различий между клетками, культивированными на разных матриксах, не наблюдалось – во всех точках эндотелиоциты имели вытянутую форму и добавление на 1 час TGFβ не влияло на это. При этом уже через 24 часа уровень транскрипционных факторов Snai1 и Slug/snai2 – важнейших маркеров запуска ЭндоМТ – значительно повышался при культивировании клеток на фиброзном матриксе. Для выяснения механизмов, задействованных в индукции этих транскрипционных факторов, нами были проанализированы несколько сигнальных путей, связанных с ЭндоМТ и с контактом с разного рода матриксами.

***Канонический TGFβ каскад.*** Пассирование и посадка клеток на матрикс существенно не влияли на активацию канонического SMAD зависимого TGFβ пути (рисунок 1).

|  |
| --- |
|  |
| **Рис. 1.** Динамика фосфорилирования SMAD2 при пассировании и через 2 часа после посадки HUVEC на матрикс. A – данные представлены в виде отношения уровня фосфорилированной формы к тотальной. Б – референтные вестерн-блот мембраны, Ф1 Ф2 – повторности для фиброзного и Н1 Н2 – повторности нормального матриксов, Жел – желатин, К – контроль, пассирование клеток. |

Это подтверждает наши данные об отсутствии или слишком низком количестве заякоренного TGFβ в децеллюляризованных ВКМ (рисунок 2).

|  |
| --- |
|  |
| **Рис. 2.** Анализ содержания TGFβ в децеллюляризованных ВКМ. 1, 2, 3, 4 – образцы, полученные с помощью различных обработок дВКМ для выделения TGFβ. |

Добавление в среду лиганда – рекомбинантного TGFβ приводило к статистически значимой активации фосфорилирования SMAD, при этом существенных различий между желатином, фиброзным и нормальным матриксами не обнаруживалось (Рисунок 3).

|  |
| --- |
|  |
| **Рис. 3.** Уровень фосфорилирования SMAD. A – диаграмма попарных сравнений уровня pSMAD2 при посадке на нормальный и фиброзный матриксы до и после добавления TGFβ. Данные представлены отношением фосфорилированной формы к тотальной, \* p < 0,05 по критерию Уилкоксона. Б – референтные изображения вестерн блот мембран. |

***Неканонический TGFβ каскад. MAPK.*** Отсутствие значимых различий в активации SMAD зависимого сигнального каскада могло быть обусловлено перенаправлением сигнала TGFβ по неканоническим каскадам. Одним из неканонических путей передачи сигнала от TGFβR является MAPK каскад, для оценки активации которого мы проанализировали динамику фосфорилирования ERK – одной из ключевых киназ данного сигнального пути.

Полученные результаты указывают на отсутствие связи между добавлением TGFβ и фосфорилированием ERK в клетках HUVEC (рисунок 4В). Так же фиброзный и нормальный матриксы не оказывали существенных воздействий на уровень pERK.

|  |
| --- |
|  |
| **Рис. 4**. Динамика фосфорилирования ERK A – при пассировании и через 2 часа после посадки HUVEC на матрикс, данные представлены в виде отношения уровня фосфорилированной формы белка к тотальной. Б, Г – референтные вестерн-блот мембраны, Ф1 Ф2 – повторности для фиброзного и Н1  Н2 –нормального матриксов, Жел – желатиновый матрикс, К – контроль, пассирование клеток. В – диаграмма попарных сравнений уровня pERK при посадке на матриксы до и после добавления TGFβ. |

***Контакт клеток с дВКМ снижал активацию интегрин-зависимого сигнального пути.*** Через 2 часа после посадки клеток на матрикс (рисунок 5A), наблюдалось заметное повышение уровня pFAK, что говорит об активации интегриновой сигнализации при контакте с внеклеточным матриксом и образовании фокальных адгезий.

|  |
| --- |
|  |
| **Рис. 5**. Динамика фосфорилирования FAK A – при пассировании и через 2 часа после посадки HUVEC на матрикс, отношение фосфорилированной формы к тотальной. Б, Г – референтные вестерн блот мембраны, Ф1 Ф2 – повторности для фиброзного и Н1 Н2 – повторности нормального матриксов, Жел – желатиновый матрикс, К – контроль, пассирование клеток. В – диаграмма попарных сравнений уровня pFAK при посадке на нормальный и фиброзный матриксы до и после добавления TGFβ. |

Таким образом, мы показали, что повышение уровня транскрипционных факторов Snai1/Slug (основных запускающих эндоМТ), в клетках HUVEC при посадке на ВКМ легочных фибробластов мышей с блеомицин-индуцированным фиброзом легких не связано напрямую с активацией или потенцированием канонического TGFβ сигнального каскада, так же, как и одного из неканонических каскадов, опосредованных активацией ERK. При этом разные по составу и жесткости фиброзный и нормальный матриксы в равной степени активировали FAK-опосредованный интегриновый сигналинг в эндотелии.

На данном этапе мы проверили не все потенциально причастные к запуску эндоМТ (и очень похожего на него ЕМТ) каскады, например, возможными индукторами Snai1/Slug могут выступать AKT [5] или   
β-катениновый/Wnt [6], YAP/TAZ [7] сигнальные пути. Возможный вклад этих путей в реализацию передачи сигнала от ВКМ эндотелиальным клеткам планируется оценить в будущих исследованиях.

Работа выполнена в рамках государственного задания МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bianchi A, Gervasi ME, Bakin A* // Cell Cycle. 2010;9(8):1647-59.

2. *Shintani Y, Fukumoto Y, Chaika N et al.* // J Cell Biol. 2008   
Mar 24;180(6):1277-89.

3. *Walters DM, Kleeberger SR* // Curr Protoc Pharmacol. 2008;Chapter 5:Unit 5.46.

4. *Grigorieva OA, Vigovsky MA, Dyachkova UD et al.* // Bull Exp Biol Med. 2021;in press.

5. *Karimi Roshan M, Soltani A, Soleimani A et al.* // Biochimie. 2019 Oct;165:229-34.

6. *Xie Y, Liao J, Yu Y et al.* // Mol Med Rep. 2018;17(1):961-9.

7. *Noguchi S, Saito A, Nagase T* // Int J Mol Sci. 2018;19(11):3674.