

РОЛЬ НЕЙРОНАЛЬНЫХ И АНГИОГЕННЫХ ФАКТОРОВ В МЕХАНИЗМАХ ИНВОЛЮЦИИ ТИМУСА ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ

КИСЕЛЕВА Е. П.

ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН»,
Санкт-Петербург

Киселева Е. П. Роль нейрональных и ангиогенных факторов в механизмах инволюции тимуса при опухолевом росте // Мед. академ. журн. 2010. Т. 10. № 4. С. 201–209. ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины СЗО РАМН», Санкт-Петербург, 197376, ул. Академика Павлова, 12.

Рост многих опухолей человека и животных сопровождается развитием инволюции тимуса. Механизмы этого процесса до сих пор неизвестны. В статье описаны современные теории и подходы к изучению этого вопроса, а также результаты многолетних исследований механизмов инволюции тимуса при росте экспериментальных опухолей у мышей. Получен ряд новых приоритетных данных о роли ростового фактора сосудистого эндотелия (VEGF) в регуляции миграции тимоцитов и развития апоптоза. Семафорин 3А оказывал хемореpellентный эффект в отношении тимоцитов и отменял действие VEGF на хемотаксис. Изучена экспрессия рецепторов VEGF и семафорина 3А на тимоцитах и строме тимуса. Полученные данные указывают на важную роль VEGF и семафорина 3А в регуляции миграции тимоцитов в норме и при опухолевом росте.

Ключевые слова: инволюция тимуса, опухоли, фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), семафорин 3А, миграция.

Kiseleva E. P. The role of angiogenic and neuronal factors in the mechanisms of thymic involution in tumor growth // Med. Acad. Journ. 2010. Vol. 10. № 4. P. 201–209. Research Institute of Experimental Medicine NWB RAMS, St. Petersburg, 197376.

The growth of many human and rodent tumors is accompanied by the development of thymic involution. The mechanisms of this process are still unknown. The article describes modern theories and approaches for studying this problem as well as the results of many years of research of the mechanisms of thymic involution during the growth of experimental tumors. New important data are received on the role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in regulation of thymocyte migration and apoptosis. Semaphorin 3A demonstrated a chemorepellent activity towards thymocytes and abolished chemotactic effect of VEGF. VEGF and Semaphorin 3A receptors were investigated on thymocytes and thymic stroma. The data obtained indicate on important role of VEGF and Semaphorin 3A in the regulation of thymocyte migration in normal conditions and tumor growth.

Key words: thymic involution, tumors, vascular endothelial growth factor, semaphorin 3A, migration.

Для корреспонденции: Киселева Екатерина Прохоровна, тел. раб (812)234-16-69, факс: (812)234-94-89, e-mail: ekissele@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

Тимус является центральным органом иммунной системы, в котором происходит дифференцировка и созревание Т-лимфоцитов, осуществляющих важные функции в защите от патогенов и иммунном надзоре за опухолевым ростом. Активность тимуса наиболее высока в раннем детстве, позднее постепенно развивается возрастная инволюция вилочковой железы. Несмотря на это, в последние годы все больше данных указывают на то, что тимус у взрослых остается активным в поздние годы жизни и генерирует функционально активные Т-клетки.

Подсчитано, что ежедневно около 1% всех тимоцитов выходит на периферию в виде наивных Т-клеток, где они пополняют пул периферических Т-лимфоцитов [47]. Количество клеток, мигрирующих из тимуса, несколько снижается с возрастом, однако сохраняется до старости и играет важную роль в развитии иммунного ответа при попадании в организм

новых антигенов [29]. В связи с этим, некоторые исследователи рассматривают число наивных Т-клеток как биомаркер старения, на основании которого даже возможно делать прогнозы продолжительности жизни в пожилом возрасте [35]. Несмотря на снижение функции тимуса, в пожилом возрасте также сохраняется и разнообразие Т-клеточных рецепторов. Нарушения тимопоэза и снижение генерации разнообразия Т-клеточных рецепторов являются важной предпосылкой для увеличения заболеваемости и смертности от инфекционных заболеваний, частоты онкологических и аутоиммунных заболеваний. Поэтому восстановление утраченной функции тимуса является важной стратегической задачей современной медицинской науки.

Однако вилочковая железа подвергается атрофическим изменениям не только с возрастом, но и при ряде заболеваний, включающих различные инфекции, СПИД, тяжелые травмы, злокачественные новообразования, сопровождающиеся развитием

акцидентальной инволюции тимуса. В отличие от возрастной инволюции, акцидентальная инволюция тимуса обратима и структура железы восстанавливается после перенесенного заболевания до уровня своей возрастной нормы.

Развитие инволюции тимуса сопровождается многими опухолями человека и животных [3]. В отличие от мышей с перевиваемыми опухолями, у которых масса тимуса резко снижается в течение нескольких недель, у людей, страдающих онкологическими заболеваниями, размеры и масса железы не изменяются столь значительно, и признаками инволюции является уменьшение площади, занимаемой островками лимфоидной ткани, и их клеточности на гистологических препаратах. В эксперименте на животных показано, что снижение массы тимуса сопровождается опустошением корковой зоны с резким уменьшением количества CD4⁺CD8⁺-timoцитов [19].

Морфологические признаки инволюции тимуса у больных, погибших от злокачественных новообразований, были впервые описаны более 80 лет назад, однако механизмы и биологическое значение этого процесса до сих пор остаются неясными. Их изучение имеет большое значение для клиники, поскольку вследствие инволюции тимуса происходит нарушение выхода Т-лимфоцитов на периферию и тем самым создаются предпосылки развития Т-клеточного иммунодефицита [23]. Созревающие в тимусе Т-лимфоциты не только защищают организм от инфекций, но являются основными клетками-эффекторами, осуществляющими цитотоксические реакции противоопухолевой защиты. Полноценное созревание тимоцитов необходимо для пациентов, подвергающихся хирургическому, радиационному и цитостатическому лечению, а восстановление лимфопоэза в полном объеме после указанных воздействий является актуальной задачей.

ОСНОВНЫЕ ТЕОРИИ РАЗВИТИЯ ИНВОЛЮЦИИ ТИМУСА ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ

Теоретически можно выделить следующие основные группы причин развития инволюции тимуса: а) дефицит костномозговых предшественников или их недостаточное поступление в тимус; б) усиленная гибель лимфоцитов внутри тимуса; в) увеличение миграции тимоцитов на периферию.

Группой американских ученых на модели перевиваемых опухолей молочных желез у мышей было показано, что клетки-предшественники тимоцитов имеются в костном мозге опухоленосителей в достаточном количестве и потенциально способны мигрировать в тимус [19], однако, возможно, что по

каким-то причинам у животных с опухолями они в тимус не поступают.

Усиление спонтанного апоптоза тимоцитов при росте перевиваемой гепатомы 22а у мышей было впервые показано в нашей лаборатории [6]. Данные по усилению апоптоза тимоцитов были полностью подтверждены двумя другими группами исследователей на разных экспериментальных моделях – аденокарциноме молочной железы и лимфоме Дальтона у мышей [13, 38]. В результате была сформулирована гипотеза о том, что усиление внутритимусной гибели лимфоцитов путем апоптоза может являться одним из механизмов развития инволюции тимуса при опухолевом росте [6, 13].

Вопрос об ускоренной или повышенной эмиграции тимоцитов на периферию давно обсуждается в литературе, хотя и не получил пока существенных доказательств. Имеется гипотеза о том, что при опухолевом росте может усиливаться выход незрелых тимоцитов, обладающих морфогенетическими функциями [1]. Авторы полагают, что такие лимфоциты мигрируют в опухоль, где поддерживают рост трансформированных клеток. Недавно было показано, что Т-лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, экспрессируют VEGF – важнейший ангиогенный фактор, и, следовательно, могут участвовать в процессах опухолевого неоангиогенеза [34], однако эти свойства не относят к незрелым Т-лимфоцитам.

Один из методов, используемых для изучения эмиграции тимоцитов, заключается во внутритимусном введении флуоресцеиновой метки с последующим выявлением меченых клеток в крови или лимфоидных органах. С помощью такого метода было показано усиление выхода тимоцитов в кровоток на раннем сроке опухолевого роста еще до развития инволюции тимуса [44]. В другой работе с помощью этого же метода изучали миграцию меченых тимоцитов в селезенку, и было показано, что на более поздних этапах опухолевого роста миграция меченых тимоцитов у мышей с опухолями и атрофией тимуса не отличалась от миграции у контрольных животных [41].

В настоящее время появился другой способ определения числа тимоцитов, недавно покинувших тимус, который основан на определении участков ДНК, сохраняющихся лишь некоторое время, но потом утрачиваемых клетками (thymic recent emigrant cells, TREC). Однако пока имеются лишь единичные исследования этого показателя у онкологических больных [23], не позволяющие делать выводы. Кроме того, известно, что появление признаков атрофии тимуса у животных сопровождается лимфопенией [2], что косвенно указывает на отсутствие усиленного выхода тимоцитов на поздних этапах роста злокачественных клеток. Следовательно, мы можем пред-

полагать усиление выхода тимоцитов на периферию лишь на ранних этапах опухолевого роста.

В литературе давно обсуждается вопрос о том, какой фактор способен вызывать инволюцию тимуса при опухолевом росте.

Существует два основных подхода к изучению этого вопроса, связанных с участием либо гормонов, либо цитокинов. В первом случае в качестве основной причины атрофии вилочковой железы рассматривают повышение уровня глюкокортикоидов, другая точка зрения связана с изучением регуляторных молекул, продуцируемых при опухолевом росте.

Известно, что глюкокортикоидные гормоны способны вызывать развитие апоптоза тимоцитов. Рост ряда опухолей в организме может сопровождаться повышением уровня содержания глюкокортикоидных гормонов в крови, и многие авторы связывали атрофию тимуса при опухолевом росте с проявлениями стресса. Однако большинство экспериментальных данных не подтверждает это предположение [3]. На многих экспериментальных моделях было показано, что уменьшение массы тимуса не коррелирует с увеличением уровня содержания кортикостероидов в крови, а адреналэктомия не отменяет процесса инволюции тимуса [19]. В наших исследованиях было проведено изучение уровня содержания кортикостерона в динамике роста сингенной перевиваемой солидной гепатомы 22а у мышей и также не обнаружено его повышения во время развития инволюции тимуса [6].

Таким образом, в настоящее время считается доказанным, что активация гипофиз-адреналовой системы не является причиной инволюции тимуса при неопластических процессах. Однако не исключена возможность увеличения локального синтеза глюкокортикоидов в вилочковой железе, что является важным фактором регуляции дифференцировки тимоцитов [37].

В качестве альтернативной версии механизма инволюции тимуса рассматривается возможное участие интерлейкинов и ростовых факторов, продуцируемых опухолевыми клетками. Известно, что многие опухоли человека и животных способны синтезировать такие цитокины, как фактор некроза опухоли альфа (TNF- α), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-6 (IL-6), трансформирующий ростовой фактор бета (TGF- β) и гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). Уровень содержания этих факторов может существенно повышаться при опухолевом росте и оказывать паракринное влияние на процессы, происходящие в тимусе.

TNF- α , IL-1, IL-4, IL-6 и TGF- β могут вызывать развитие инволюции тимуса при введении их в организм интактных животных или у трансгенных мышей, которым трансфицирован соответствующий ген

человека [20]. Кроме того, TNF- α способен вызывать апоптоз тимоцитов [15], а IL-4 блокирует дифференцировку тимоцитов на раннем этапе их созревания *in vitro* [36]. Однако каких-либо данных о непосредственном участии этих цитокинов в процессе инволюции тимуса при опухолевом росте в настоящее время не получено. Влияние GM-CSF в качестве потенциального индуктора атрофии тимуса при опухолевом росте было подробно изучено [19], однако его причастность к этому процессу также не доказана.

В наших исследованиях на модели роста гепатомы 22а у мышей мы исследовали связь между появлением морфологических признаков развития инволюции тимуса и уровнями содержания TNF- α и IL-6 в сыворотке крови и не обнаружили какой-либо зависимости [2]. Неудачные попытки идентифицировать цитокин, вызывающий инволюцию тимуса при опухолевом росте, побудили нас к поиску других кандидатов на эту роль.

РОЛЬ РОСТОВОГО ФАКТОРА СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ (VEGF) В РАЗВИТИИ ИНВОЛЮЦИИ ТИМУСА ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ

VEGF является одним из основных ангиогенных факторов, оказывающих митогенное действие на клетки эндотелия *in vitro* и стимулирующих рост сосудов *in vivo*. VEGF продуцируется почти всеми опухолевыми клетками и играет основную роль в регуляции опухолевого неоангиогенеза [8]. Уровень его содержания в крови значительно повышается при развитии неоплазм у человека и животных [11, 34], благодаря чему этот фактор может проявлять в организме системное действие. Помимо своего основного ангиогенного действия VEGF обладает также и рядом иммунорегуляторных свойств [5].

VEGF играет важную роль в инициации процесса воспаления, поскольку является фактором усиления проницаемости сосудистой стенки. Это один из самых сильных индукторов сосудистой проницаемости, он усиливает проницаемость для коллоидных белков в 50 000 раз сильнее, чем гистамин. VEGF не только повышает проницаемость эндотелиального барьера для воды и макромолекул, но и усиливает миграцию клеток через эндотелий, что способствует накоплению лейкоцитов в очаге воспаления или повреждения. Этот эффект описан для моноцитов крови человека [39], полиморфноядерных лейкоцитов [24] и гемопоэтических стволовых клеток [31]. При этом VEGF способен оказывать влияние как на эндотелий, так и на мигрирующие клетки. Одним из этапов экстравазации является подготовка эндотелия, которая состоит из процессов сокращения эндотелиальных клеток и увеличения экспрессии на них адгезионных

молекул, необходимых для контакта с лейкоцитами [22]. Кроме того, VEGF индуцирует в клетках эндотелия секрецию хемокинов MCP-1, SDF-1 и IL-8, необходимых для привлечения клеток [24].

VEGF обладает способностью стимулировать синтез матриксной металлопротеиназы MMP9, причем не только в эндотелиальных клетках, но и в Т-лимфоцитах [34]. Этот фермент принимает непосредственное участие в миграции Т-лимфоцитов через базальную мембрану эндотелиальных клеток.

Помимо своей способности усиливать трансэндотелиальную миграцию клеток, VEGF также является хемоаттрактантом для моноцитов крови человека [39] и гемопозитических клеток [26], что обеспечивает их рекрутирование в ишемизированные области тканей и опухоли.

Таким образом, в литературе сформировалось представление о VEGF как о факторе, действующем не только на эндотелий, но и на миграцию клеток разных типов, в том числе клеток иммунной системы.

В 2003 г. в нашей совместной работе с американскими исследователями было впервые показано, что длительное (в течение 3–4 нед) введение VEGF интактным мышам вызывает у них развитие инволюции тимуса, по динамике, гистологической картине и фенотипическим характеристикам близкое к тем изменениям, которые были описаны при росте перевиваемой опухоли [33]. Создаваемая в сыворотке крови концентрация VEGF соответствовала содержанию этого фактора в циркуляции при росте опухолей. При введении в организм мышей-опухоленосителей препаратов, нейтрализующих действие VEGF в организме, была доказана возможность останавливать развитие инволюции тимуса. Позднее полученные данные привлекли к изучению этого вопроса внимание и других исследователей [16].

Кроме того, нами была показана способность VEGF усиливать развитие спонтанного апоптоза тимоцитов *in vivo* и *in vitro* [4]. Мы рассматривали усиление апоптоза тимоцитов как один из механизмов развития инволюции тимуса при опухолевом росте [6], однако эффект от действия VEGF был недостаточным для того, чтобы считать его основным механизмом. В связи с этим, нами была сформулирована новая гипотеза о том, что VEGF способен усиливать выход тимоцитов на периферию.

Прежде всего, мы попытались провести сопоставление между сывороточным уровнем VEGF при росте перевиваемой гепатомы 22a и морфологическими признаками развития инволюции тимуса. Однако, несмотря на то, что гепатома является VEGF-продуцирующей опухолью, уровень содержания VEGF в крови животных не повышался на всех сроках исследования от первой до пятой недели роста опухоли

[7]. После этого мы предположили, что инволюция тимуса может быть связана с повышенным синтезом VEGF не в опухоли, а локально в тимусе, и поставили задачу охарактеризовать синтез этого фактора внутри тимуса.

Во взрослом организме VEGF экспрессируется практически во всех васкуляризованных тканях, что предполагает его важную физиологическую роль для поддержания общего сосудистого гомеостаза. Эффекты VEGF сильно зависят от его локальной концентрации в тканях. Считается, что низкие концентрации VEGF необходимы для гомеостаза кровеносных сосудов и выживаемости эндотелиальных клеток [46]. Значительно более высокие концентрации VEGF необходимы для проявления его ангиогенных эффектов.

До начала наших исследований было уже известно, что в цельном тимусе мышей осуществляется синтез мРНК и белка VEGF [30]. В наших экспериментах тимус был разделен на две части – изолированные тимоциты и строма без тимоцитов. Было показано, что как тимоциты, так и строма тимуса мышей могут конститутивно экспрессировать мРНК VEGF [10]. Синтез VEGF в культуре стромальных клеток тимуса мышей был также показан другими авторами [18]. Мы провели изучение синтеза VEGF в строме тимуса в динамике роста гепатомы, и было показано, что на первой неделе, а также на поздних сроках (3–4 неделя) синтез мРНК VEGF был достоверно повышен по сравнению с тем же показателем у контрольных мышей, которым вводили физиологический раствор [7].

Затем нами был изучен синтез рецепторов VEGF в тимоцитах. Известно, что на клетках эндотелия существует два основных рецептора VEGF: VEGFR-1 и VEGFR-2, а также корецептор нейропилин-1 (Nrp-1). Оказалось, что в тимоцитах интактных мышей конститутивно экспрессируются гены VEGFR-2 и NRP-1 и не выявляется мРНК VEGFR-1 [10]. При этом синтез мРНК VEGFR-2 в тимоцитах животных опухоленосителей был усилен на тех же сроках, когда зарегистрировали повышение экспрессии мРНК VEGF в строме тимуса [7]. При исследовании рецепторов VEGF с помощью проточной цитометрии нами было показано, что экспрессия рецептора VEGFR-2 на тимоцитах интактных мышей слабо выражена, а корецептор Nrp-1 выявляется на 50–60% тимоцитов, что соответствует данным литературы [18].

Поскольку на тимоцитах были обнаружены рецепторы VEGF, а в строме тимуса опухоленосителей повышенный синтез мРНК VEGF, мы провели исследование прямого действия VEGF на миграцию тимоцитов мышей *in vitro* [9]. Эксперименты проводили с помощью модифицированной камеры Бойдена, разделенной на две части: в верхнюю часть вносили

тимоциты, а в нижнюю – исследуемый фактор. После чего инкубировали в течение 4 ч и подсчитывали процент мигрировавших клеток от числа внесенных в верхние лунки. В качестве стандартного стимулятора хемотаксиса тимоцитов использовали хемокин SDF-1 α . При внесении этого фактора в нижние камеры в концентрации 400 нг/мл наблюдали стимуляцию хемотаксиса тимоцитов 5,29% \pm 0,61 (индекс спонтанной миграции составил 1,60% \pm 0,01 p <0,001; n =13). VEGF дозозависимо усиливал миграцию тимоцитов с максимальным эффектом в концентрации 100 нг/мл: 2,26% \pm 0,10 (p <0,01; n =30). Для того, чтобы оценить, была ли стимуляция миграции направленной, VEGF вносили и в верхние, и в нижние камеры одновременно. При этом наблюдали отсутствие эффекта.

Таким образом, нами было впервые показано, что VEGF усиливает хемотаксис тимоцитов мышей, хотя этот эффект выражен слабее по сравнению с известным хемоаттрактантом тимоцитов SDF-1 α . Полученные нами данные согласуются с недавно опубликованными результатами других исследователей, которые показали хемотаксический эффект VEGF в отношении активированных Т-лимфоцитов крови человека [40].

Далее в наших исследованиях было изучено, через какой рецептор опосредуется хемотаксический эффект VEGF в отношении тимоцитов мышей. Прединкубация тимоцитов с блокирующими антителами к VEGFR-2 отменяла действие VEGF на миграцию клеток, а прединкубация с антителами к VEGFR-1 – не отменяла. При этом прединкубация тимоцитов с антителами к рецепторам VEGF не влияла на эффект SDF-1 α . Тем самым было показано, что для реализации действия VEGF необходимо присутствие VEGFR-2 на тимоцитах, несмотря на его низкую экспрессию. Наши данные дополняют исследования американских ученых, которые доказали необходимость взаимодействия VEGF именно с этим рецептором VEGFR-2 (а не с VEGFR-1) для развития инволюции тимуса в организме мышей, которым вводили VEGF [21].

Следующим этапом нашей работы было сравнение хемотаксической активности тимоцитов у животных с гепатомой 22а и интактных животных в условиях оптимальной (100 нг/мл) и субоптимальной (10 нг/мл) концентраций VEGF *in vitro* [9]. Изучение миграционной активности тимоцитов проводили на 3-й нед опухолевого роста еще до появления признаков инволюции тимуса. Спонтанная миграция тимоцитов у мышей с гепатомой 22а была ниже в 2 раза (0,7% \pm 0,1), чем у интактных 1,6% \pm 0,01 (p <0,001; n =4). VEGF в концентрации 10 нг/мл у интактных животных не стимулировал миграцию клеток, тогда как у животных-опухоленосителей наблюдалось

значительное усиление миграционной активности тимоцитов, в 2,2 раза по сравнению со спонтанной миграцией (1,5% \pm 0,03 p <0,01; n =4). VEGF в концентрации 100 нг/мл увеличивал миграцию клеток и у интактных мышей 2,5% \pm 0,3 (p <0,05; n =4) и у мышей с гепатомой 22а 2,1% \pm 0,2 (p <0,01; n =4) в одинаковой степени.

После этого мы изучали способность VEGF влиять на трансэндотелиальную миграцию тимоцитов [9]. Для проведения трансмиграции в верхние камеры заранее вносили эндотелиальные клетки линии EA.hy 926 и инкубировали 24 ч до образования конфлюэнтного монослоя, после чего туда помещали тимоциты и оценивали количество клеток, мигрировавших в нижние лунки через монослой эндотелиалия. Спонтанная миграция тимоцитов составила 1,2% \pm 0,1 от внесенных клеток. В качестве положительного контроля был использован TNF- α в концентрации 50 ед/мл, который увеличивал миграцию клеток до 2,4% \pm 0,6. Внесение VEGF в нижние камеры в диапазоне доз от 10 до 100 нг/мл оказывало стимулирующее влияние на миграцию с максимальным эффектом в концентрации 50 нг/мл: процент мигрировавших клеток через эндотелий увеличивался в 1,6 раза по сравнению с контролем (1,9% \pm 0,2 p <0,01; n =7). Таким образом, эффект VEGF на трансэндотелиальную миграцию тимоцитов был сопоставим с действием TNF- α .

В другой постановке эксперимента предобработка эндотелия в течение 4 ч с помощью TNF- α или VEGF (50 нг/мл) усиливала трансмиграцию тимоцитов (спонтанная миграция 1,2% \pm 0,1; при обработке эндотелия с помощью TNF- α : 3,4% \pm 0,3 p <0,001; n =4; при обработке VEGF: 2,33% \pm 0,2 p <0,01; n =4). У животных с гепатомой на 3-й нед роста было выявлено снижение способности тимоцитов мигрировать через монослой эндотелия.

Полученные нами данные указывают на то, что VEGF играет важную роль в процессах миграции тимоцитов и их способности проходить через эндотелий. Тимоциты животных опухоленосителей обладали повышенной чувствительностью к субоптимальной концентрации VEGF, однако мы не наблюдали усиления их трансмиграции через монослой эндотелиальных клеток. Возможно, что усиление миграции происходит лишь на ранних этапах роста опухоли или оно касается небольшой популяции тимоцитов, вклад которой недостаточно заметен в наших экспериментах. Кроме того, можно предположить, что действие VEGF является непрямым и связано с каким-то другим фактором.

К этому времени в литературе появились новые представления о механизме действия VEGF на миграцию опухолевых клеток и их способность к метастазированию [14]. Авторами была высказана

гипотеза о том, что выход клеток из опухолевого узла зависит не от одного VEGF, а от баланса VEGF и семафорина 3А в тканях, поскольку оба эти фактора регулируют миграцию опухолевых клеток, а также имеют один общий рецептор Nrp-1, за связывание с которым между ними может происходить конкуренция. Далее мы попытались использовать эту гипотезу для объяснения регуляции выхода тимоцитов из тимуса и изучить роль баланса между VEGF и семафоринном 3А в тимусе при росте гепатомы.

РОЛЬ СЕМАФОРИНА 3А В РАЗВИТИИ ИНВОЛЮЦИИ ТИМУСА ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ

Семафорины первоначально были описаны, как факторы, определяющих направление роста нервов, однако позднее оказалось, что их действие гораздо шире и касается клеток разных типов, в том числе и клеток иммунной системы [42]. Семафорины, в отличие от VEGF, который является ростовым фактором и стимулирует пролиферацию клеток эндотелия, митогенными свойствами не обладают. Действие семафоринов направлено на регуляцию миграции подвижных клеток, а на аксоны они действуют как хеморепелленты, вызывая их отталкивание [17]. У позвоночных известно 5 классов семафоринов III–VII. Большинство из них являются мембранно-связанными факторами, и только семафорины III класса секретируются и способны создавать градиенты концентраций в организме. Существует несколько семафоринов III класса – Sema3A–Sema3G, из которых основным считается семафорин 3А.

Семафорин 3А, так же как и VEGF, является фактором, усиливающим проницаемость эндотелия. Причем, несмотря на конкурентные взаимоотношения по ряду функций из-за общего рецептора – Nrp-1, эффекты по усилению сосудистой проницаемости от семафорина и VEGF суммируются и реализуются по разным путям проведения сигналов [12]. Недавно было показано, что семафорин 3А необходим для трансэндотелиальной миграции дендритных клеток и усиливает их выход из тканей в лимфоток, вызывая в них активацию актомиозина [43]. Кроме того, было показано, что семафорин 3А содержится в тимоцитах и эпителиальных клетках тимуса человека, подавляет адгезию тимоцитов к эпителиальным клеткам и осуществляет хеморепеллентный эффект в отношении разъединения контактов между тимоцитами и эпителиальными клетками, причем это действие реализуется при участии рецептора Nrp-1 [25].

Основываясь на приведенных данных литературы, мы начали изучать влияние семафорина 3А на миграцию и адгезию тимоцитов мышей *in vitro*, а

также в некоторых экспериментах изучали совместное влияние семафорина 3А и VEGF.

Эксперименты по изучению влияния семафорина на миграцию тимоцитов проводили в тех же условиях, что и влияние VEGF, однако, в отличие от VEGF, который вносили в нижние камеры, семафорин вносили в верхние камеры вместе с тимоцитами для оценки хеморепеллентного эффекта. В этом случае 100 нг/мл семафорина вызывало увеличение числа мигрировавших тимоцитов в 1,4 раза по сравнению со спонтанной миграцией.

При внесении семафорина 3А так же, как ранее вносили VEGF, в нижнюю камеру в концентрации 100 нг/мл, напротив, наблюдали снижение числа мигрировавших клеток в 1,6 раза по сравнению со спонтанной миграцией (контроль $4,47\% \pm 0,18$; при добавлении семафорина $1,96\% \pm 0,25$; $n=7$, $p<0,001$). Семафорин 3А в меньшей концентрации (10 нг/мл) не оказывал влияния на миграцию клеток. При добавлении фактора в верхние и нижние камеры одновременно не наблюдали эффекта.

Предобработка тимоцитов моноклональными антителами к нейропилину-1 отменяла эффект семафорина 3А. Прединкубация клеток с антителами к VEGFR-2, которые использовали в качестве отрицательного контроля, не изменяла процент мигрировавших клеток в ответ на семафорин 3А.

При внесении в нижние камеры одновременно VEGF и семафорина 3А в эквимоллярных (1,2 мкМ) концентрациях наблюдали отмену эффекта и семафорина 3А, и VEGF. Процент мигрировавших тимоцитов был на уровне спонтанной миграции клеток.

Выход тимоцитов из тимуса на периферию – сложный процесс, одним из начальных этапов которого является адгезия к эндотелиальным клеткам. Спонтанная адгезия тимоцитов к эндотелиальным клеткам линии EA.hy 926 в отсутствие факторов составляла $2,05\% \pm 0,05$ ($n=10$) от числа внесенных клеток. В качестве положительного контроля использовали 50 ед/мл TNF- α , прединкубация с которым приводила к увеличению числа адгезировавших клеток в 1,8 раза ($3,66\% \pm 0,37$; $p<0,01$; $n=8$). Аналогичный эффект оказывал VEGF (100 нг/мл). При этом процент тимоцитов, которые адгезировали на монослой эндотелия увеличивался в 1,5 раза ($3,09\% \pm 0,18$; $p<0,01$; $n=10$). VEGF в меньшей концентрации (10 нг/мл) не оказывал эффекта. SDF-1 α (400 нг/мл) и семафорин 3А (100 нг/мл) не оказывали действия.

Рецепторами для семафоринов служат плексины, связанные с тирозин киназой. Семафорины III класса, в отличие от других семафоринов, используют для своего взаимодействия с клетками не просто плексины, а рецепторный комплекс, состоящий из плексина и нейропиллина, где нейропилин связывает лиганд, а плексин осуществляет проведение сигнала

ла. Семафоринный рецептор на периферических Т-лимфоцитах еще не определен, хотя показана важная роль плексина А4 для функционирования Т-клеток [45]. На тимоцитах человека с помощью проточной цитометрии выявлено наличие плексинов А1 и А2 [28].

В наших исследованиях с помощью метода ОТ-ПЦР было показано, что в тимоцитах интактных мышей экспрессируется мРНК плексина А1 и не выявляется мРНК плексина А4 в пределах чувствительности данного метода. Кроме того, была выявлена экспрессия мРНК семафорина 3А в тимоцитах и строме тимуса интактных мышей, причем экспрессия в строме была значительно более выражена. Экспрессия мРНК Nrp-1 была также хорошо выражена и в строме и в тимоцитах. Впервые была исследована экспрессия мРНК плексина А1 в тимоцитах мышей при опухолевом росте, однако различия в экспрессии между контрольными мышами и животными с гепатомой не обнаружено.

Таким образом, было показано, что VEGF вызывает хемоаттракцию тимоцитов, тогда как семафорин 3А проявляет хемореpellентные свойства. Ответ тимоцитов на VEGF опосредован через VEGFR-2, а на семафорин 3А – через нейропептин-1. Кроме того, VEGF усиливает адгезию тимоцитов к эндотелию, а семафорин 3А не оказывает влияния. Полученные данные позволяют предположить возможную роль VEGF и семафорина 3А в регуляции миграции тимоцитов *in vivo* и развитии акцидентальной инволюции тимуса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инволюция тимуса и развитие Т-клеточного иммунодефицита являются характерными признаками опухолевого роста. Несмотря на то, что качественные и количественные характеристики этих процессов подробно изучены, ни причина, ни способы борьбы с этими нарушениями неизвестны. Более того, и роль Т-лимфоцитов при росте злокачественных новообразований полностью не определена и сводится лишь к известной гипотезе иммунного надзора. Новые данные о роли Т-лимфоцитов в процессах ангиогенеза и восстановления тканей, а также участие адаптивного иммунитета в реакциях на эндогенные сигналы, связанные с повреждением, позволяют внести значительные коррективы в наши представления [27].

Участие VEGF в механизмах инволюции тимуса наиболее доказано. Он может вызывать запустевание железы при введении интактным животным, а применение блокирующих антител у животных с опухолями задерживает развитие инволюции тимуса. Нами были получен ряд новых данных о роли VEGF в механизмах развития инволюции тимуса при опухолевом росте, в частности, участие этого

фактора в развитии апоптоза тимоцитов, регуляции их хемотаксиса и трансэндотелиальной миграции. Выявление нежелательных иммунодулирующих эффектов этого фактора имеет большие перспективы для их коррекции, поскольку в настоящее время разработано значительное количество способов анти-VEGF терапии, включающей применение антител, антирецепторных препаратов и рибозимов. Таким образом, анти-ангиогенная терапия может применяться не только для подавления роста сосудов, но и для устранения иммунодепрессивного влияния избыточного ангиогенеза.

В том случае, если в механизмах инволюции тимуса будет доказано участие семафорина, то это значительно усложнит ситуацию, поскольку, в отличие от VEGF, семафорин обладает антиангиогенными свойствами, его эффекты направлены на подавление опухолевого роста, и он сам может быть использован в качестве противоопухолевого препарата [32]. Таким образом, изучение влияния и VEGF, и семафорина на клетки иммунной системы является чрезвычайно актуальным и позволит более целенаправленно использовать новые препараты с учетом их влияния на иммунитет. Целью дальнейших исследований является разработка новых способов иммунотерапии, дополняющих и улучшающих эффективность основных способов лечения онкологических больных.

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-00429.

Литература

1. Гранов А.М., Шутко А.Н. Парадоксы злокачественного роста и тканевой несовместимости. СПб.: Гиппократ, 2002.
2. Киселева Е.П. Механизмы инволюции тимуса и активации системы мононуклеарных фагоцитов при росте экспериментальных опухолей: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Институт экспериментальной медицины РАМН. СПб., 2002. 38 с.
3. Киселева Е.П. Механизмы инволюции тимуса при опухолевом росте // Усп. совр. биол. 2004. Т. 124. № 6. С. 102–114.
4. Киселева Е.П., Крылов А.В., Людыно В.И., Суворов А.Н. Влияние VEGF на пролиферацию и апоптоз тимоцитов мышей *in vitro* // Бюл. эксп. биол. мед. 2005. Т. 139. № 5. С. 533–537.
5. Киселева Е.П., Крылов А.В., Старикова Э.А., Кузнецова С.А. Фактор роста сосудистого эндотелия и иммунная система // Усп. совр. биол. 2009. Т. 129. № 4. С. 336–347.
6. Киселева Е.П., Суворов А.Н., Огурцов Р.П. Роль апоптоза в процессе инволюции тимуса при росте сингенной перевиваемой опухоли у мышей // Изв. АН. Сер. Биология. 1998. № 2. С. 172–179.
7. Крылов А.В. Экспрессия генов фактора роста эндотелия сосудов и тромбоспондина-1 в клетках тимуса и перитонеальных макрофагах мышей при опу-

- холевом росте: Автореф. дис. ... канд. мед наук. Институт экспериментальной медицины РАМН. СПб., 2008. 21 с.
8. Кузнецова О.М., Кушлинский Н.Е., Березов Т.Т. Фактор роста эндотелия сосудов: особенности секреции в костной ткани в норме и при патологии // Биомед. хим. 2003. Т. 49. № 4. С. 360–373.
 9. Лямина И.В. Влияние VEGF на миграцию *in vitro* тимоцитов интактных мышей и мышей-опухоленосителей // Вестн. уральск. академ. науки. 2009. № 2/1 (24). С. 268–269.
 10. Степанова О.И., Крылов А.В., Людыно В.И., Киселева Е.П. Экспрессия генов VEGF-A и VEGF-C и их рецепторов в лимфоцитах и макрофагах мышей // Биохимия. 2007. Т. 72. № 11. С. 1468–1473.
 11. Трапезникова М.Ф., Шибяев А.Н., Казанцева И.А. и др. Фактор роста эндотелия сосудов у пациентов с раком простаты и доброкачественной гиперплазией железы // Вестн. РАМН. 2005. № 5. С. 14–16.
 12. Acevedo L.M., Barillas S., Weis S.M. et al. Semaphorin 3A suppresses VEGF-mediated angiogenesis yet acts as vascular permeability factor // Blood. 2008. Vol. 111. P. 2674–2680.
 13. Adkins B., Charyulu V., Sun Q.-L. et al. Early block in maturation is associated with thymic involution in mammary tumor-bearing mice // J. Immunol. 2000. Vol. 164. P. 5635–5644.
 14. Bachelder R.E., Lipscomb E.A., Lin X. et al. Competing autocrine pathways involving alternative neuropilin-1 ligands regulate chemotaxis of carcinoma cells // Cancer Res. 2003. Vol. 63. P. 5230–5233.
 15. Baseta J.G., Stutman O. TNF regulates thymocyte production by apoptosis and proliferation of the triple negative (CD3-CD4-CD8-) subset // J. Immunol. 2000. Vol. 165. P. 5621–5630.
 16. Cario R., Altman N.H., Lopez D.M. Downregulation of interleukin-7 and hepatocyte growth factor in the thymic microenvironment is associated with thymus involution in tumor-bearing mice // Cancer Immunol. Immunother. 2009. Vol. 58. P. 2059–2072.
 17. Casazza A., Fazzari P., Tamagnone L. Semaphorin signals in cell adhesion and cell migration: Functional role and molecular mechanisms // Semaphorin: Receptor and intracellular signaling mechanisms / J. Pasterkamp ed. Landes Bioscience. 2006. P. 1–19.
 18. Corbel C., Lemarchandel V., Thomas-Vaslin V. et al. Neuropilin 1 and CD25 co-regulation during early murine thymic differentiation // Dev. Comp. Immunol. 2007. Vol. 31. P. 1082–1094.
 19. Fu Y., Paul R.D., Wang Y., Lopez D.M. Thymic involution and thymocyte phenotypic alterations induced by murine mammary adenocarcinomas // J. Immunol. 1989. Vol. 143. P. 4300–4307.
 20. Gruver A.L., Sempowski G.D. Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy // J. Leuk. Biol. 2008. Vol. 84. P. 915–923.
 21. Huang Y., Chen X., Dikov M.M. et al. Distinct roles of VEGFR-1 and -2 in the aberrant hematopoiesis associated with elevated levels of VEGF // Blood. 2007. Vol. 110. P. 624–631.
 22. Kim I., Moon S., Kim S. H. et al. Vascular endothelial growth factor expression of Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through Nuclear Factor- κ B activation in endothelial cells // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 7614–7620.
 23. Kuss I., Schaefer C., Godfrey T.E. et al. Recent thymic emigrants and subsets of naive and memory T cells in the circulation of patients with head and neck cancer // Clin. Immunol. 2005. Vol. 116. P. 27–36.
 24. Lee T.H., Avraham H., Lee S., Avraham S. Vascular endothelial growth factor modulates neutrophil transendothelial migration via up-regulation of interleukin-8 in human brain microvascular endothelial cells // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277. P. 10445–10451.
 25. Lepelletier Y., Smaniotto S., Hadj-Slimane R. et al. Control of human thymocyte migration by neuropilin-1/semaphorin-3A-mediated interactions // Proc. Natl. Acad. Sci. 2007. Vol. 104. P. 5545–5550.
 26. Luttun A., Tjwa M., Moons L. et al. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1 // Nat. Med. 2002. Vol. 8. P. 831–840.
 27. Manfredi A.A., Capobianco A., Bianchi M.E., Rovere-Querini P. Regulation of dendritic- and T-cell fate by injury-associated endogenous signals // Crit. Rev. Immunol. 2009. Vol. 29. P. 1–18.
 28. Mendes-da-Cruz D.A., Lepelletier Y., Brignier A.C. et al. Neuropilins, semaphorins, and their role in thymocyte development // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2009. Vol. 1153. P. 20–28.
 29. Mitchell W.A., Meng I., Nicholson S.A., Aspinall R. Thymic output, ageing and zinc // Biogerontology. 2006. Vol. 7. P. 461–470.
 30. Mor F., Quintana F.J., Cohen I.R. Angiogenesis-inflammation cross talk: Vascular endothelial growth factor is secreted by activated T Cells and induces TH1 polarization // J. Immunol. 2004. Vol. 172. P. 4618–4623.
 31. Naiyer A.J., Jo D.Y., Ahn J. et al. Stromal derived factor-1-induced chemokinesis of cord blood CD34(+) cells (long-term culture-initiating cells) through endothelial cells is mediated by E-selectin // Blood. 1999. Vol. 15. P. 4011–4019.
 32. Neufeld G., Kessler O. The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis // Nature Rev. Cancer. 2008. Vol. 8. P. 632–645.
 33. Ohm J.E., Gabrilovich D.I., Sempowski G.D. et al. VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression // Blood. 2003. Vol. 101. P. 4878–4886.
 34. Owen J.L., Iragavarapu-Charyulu V., Gunja-Smith Z. et al. Up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in T-lymphocytes of mammary tumor bearers: role of vascular endothelial growth factor // J. Immunol. 2003. Vol. 171. P. 4340–4351.

35. Pfister G., Savino W. Can the immune system still be efficient in the elderly? An immunological and immunoenocrine therapeutic perspective // *Neuroimmunomodulation*. 2008. Vol. 15. P. 351–364.
36. Plum J., De Smedt M., Leclercq G., Tison B. Inhibitory effect of murine recombinant IL-4 on thymocyte development in fetal thymus organ cultures // *J. Immunol.* 1990. Vol. 145. P. 1066–1073.
37. Savino W., Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology // *Endocrinol. Rev.* 2000. Vol. 21. P. 412–443.
38. Shanker A., Singh S.M., Sodhi A. Ascitic growth of a spontaneous transplantable T cell lymphoma induces thymic involution. 2. Induction of apoptosis in thymocytes // *Tumour. Biol.* 2000. Vol. 21. P. 315–327.
39. Shen H., Clauss M., Ryan J. et al. Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes // *Blood*. 1993. Vol. 81. P. 2767–2773.
40. Shin J.-Y., Yoon I.-H., Kim J.-S. et al. Vascular endothelial growth factor-induced chemotaxis and IL-10 from T cells // *Cell. Immunol.* 2009. Vol. 256. P. 72–78.
41. Sun Q.-L., Charyulu V., Lobo D., Lopez D.M. Role of thymic stromal cell dysfunction in the thymic involution of mammary tumor-bearing mice // *Anticancer Res.* 2002. Vol. 22. P. 91–96.
42. Suzuki K., Kumanogoh A., Kikutani H. Semaphorins and their receptors in immune interactions // *Nature Immunol.* 2008. Vol. 9. P. 17–23.
43. Takamatsu H., Takegahara N., Nakagawa Y. et al. Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activation myosin II // *Nature Immunol.* 2010. published online 30 May 2010, doi:10.1038/ni.1885.
44. Tanaka K., Koga Y., Taniguchi K. et al. T cell recruitment from the thymus to the spleen in tumor-bearing mice. I. Analysis of recruited cells by surface markers // *Cancer Immunol. Immunother.* 1986. Vol. 22. P. 37–42.
45. Yamamoto M., Suzuki K., Okuno T. et al. Plexin-A4 negatively regulates T lymphocyte responses // *Int. Immunol.* 2008. Vol. 20. P. 413–420.
46. Yla-Herttuala S., Rissanen T.T., Vajanto I., Hartikainen J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2007. Vol. 49. P. 1015.
47. Zachariah M.A., Cyster J.G. Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction // *Science*. 2010. Vol. 328. P. 1129–1135.