

## РЕГУЛЯЦИЯ ПРОДУКЦИИ ФАКТОРА РОСТА СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ (VEGF) В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЭПИТЕЛИЯ ТИМУСА МЫШИ

© К. В. Рутто,<sup>1,\*</sup> И. В. Лямина,<sup>1</sup> И. В. Кудрявцев,<sup>1,2</sup> Е. П. Киселева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376,  
и <sup>2</sup> Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета, Владивосток, 690091;  
\* электронный адрес: krispins-90@mail.ru

Фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) во взрослом организме синтезируется эпителиальными клетками тимуса в небольшом количестве и выполняет функции поддержания сосудистого гомеостаза. Однако роль VEGF значительно возрастает при восстановлении тимуса после инволюции, вызванной химио-, рентгено- или гормонотерапией. Целью нашей работы было изучение влияния различных факторов на продукцию VEGF эпителиальными клетками тимуса мыши *in vitro*. В качестве модели были использованы клеточные линии кортикального сTEC1-2 и медуллярного mTEC3-10 эпителия тимуса. Эти клетки были охарактеризованы по способности синтезировать мРНК и белок VEGF, а также по наличию в них рецепторов VEGF (VEGFR). Экспрессии мРНК VEGFR1 и VEGFR2 в этих клетках не выявлены, а экспрессия нейропилина-1 (NRP-1) выражена слабо. С помощью иммуноферментного метода было показано, что клетки сTEC1-2 продуцируют VEGF в 30 раз больше, чем mTEC3-10. Клеточные линии по-разному отвечали на добавление цитокинов, гормональных препаратов, а также тимоцитов. Добавление ростового фактора кератиноцитов (KGF) повышало экспрессию мРНК и продукцию VEGF в медуллярных и одновременно с этим понижало экспрессию мРНК VEGF в кортикальных клетках. Дексаметазон подавлял продукцию VEGF и экспрессию мРНК VEGF в кортикальных клетках, в то время как в медуллярных снижал только продукцию. Добавление IL-7, IL-1β или тимоцитов мышей стимулировало, а добавление семафорина 3A, SDF-1α или АКТГ подавляло продукцию VEGF в кортикальных эпителиальных клетках, не влияя при этом на медуллярные. Мы предполагаем, что наши данные, полученные *in vitro*, могут быть использованы в дальнейшем для разработки программ целенаправленной регуляции синтеза VEGF в клетках эпителия тимуса в организме.

**Ключевые слова:** тимус, эпителиальные клетки, сTEC1-2, mTEC3-10, фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), фактор роста кератиноцитов (KGF), дексаметазон, VEGFR1, VEGFR2, нейропилин-1 (NRP-1).

**Принятые сокращения:** ИФА — иммуноферментный анализ, ОТ-ПЦР — обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией, АКТГ — адренокортикотропный гормон.

Фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) является одним из важнейших ангиогенных факторов и экспрессируется во всех васкуляризованных тканях, в том числе и органах иммунной системы. Показано, что в тимусе человека и мыши VEGF синтезируется эпителиальными клетками (Corbel et al., 2007; Cimpean et al., 2008), причем его синтез наиболее выражен в эмбриональном и неональном периодах (Muller et al., 2005; Cuddihy et al., 2009). В это время VEGF необходим для формирования сосудистой сети тимуса, поскольку нокаут этого гена в эпителиальных клетках приводит к гиповаскуляризации и нарушению архитектуры сосудов вилочковой железы (Muller et al., 2005).

Во взрослом организме VEGF в тимусе утрачивает свою ангиогенную активность и содержится в нем лишь в небольшом количестве (Cuddihy et al., 2009). Считается, что физиологическая роль VEGF заключается в поддержании сосудистого гомеостаза, регуляции проницаемости эндотелиального барьера и трансэндотелиальной миграции клеток (Yla-Hertuala et al., 2007). Состояние

сосудов играет важную роль как для пополнения тимуса пре-Т-лимфоцитами, поступающими из костного мозга, так и для выхода тимоцитов на периферию.

Однако потребность в локальном синтезе VEGF и его ангиогенной активности резко возрастает при восстановлении вилочковой железы после инволюции тимуса, вызванной применением химио-, гормоно- или рентгенотерапии. Было показано, что нормализация тимопоэза у мышей после применения циклоfosфамида сопровождается reparативным ангиогенезом, а увеличение числа сосудов в тимусе коррелирует с повышением в нем синтеза и содержания VEGF (Park et al., 2007). Таким образом, целенаправленная регуляция синтеза VEGF в тимусе является одним из подходов к решению важной медицинской задачи — коррекции Т-клеточного иммунодефицита.

Целью нашей работы было изучение влияния различных цитокинов и гормонов на продукцию VEGF эпителиальными клетками тимуса. В качестве модели были использованы клеточные линии кортикального и медуллярного эпителия тимуса мыши сTEC1-2 и mTEC3-10, в

которых мы выявили способность к синтезу VEGF. Полученные данные о стимуляции синтеза VEGF в клетках эпителия тимуса с помощью ряда цитокинов (KGF, IL-7 и IL-1 $\beta$ ) *in vitro* могут быть использованы в дальнейшем для разработки программ восстановления вилочковой железы. Кроме того, было показано подавление продукции VEGF в клетках эпителия тимуса при добавлении дексаметазона, что существенно дополняет наши представления о противовоспалительном и антиangiогенном действии этого препарата.

## Материал и методика

**Клеточные культуры.** Работу проводили на двух линиях тимусного эпителия мышей — кортикального сTEC1-2 и медуллярного mTEC3-10, любезно предоставленных в наше распоряжение проф. М. Kasai из Токийского университета (Kasai, Mizuochi, 2007). Первоначально клеточные линии были получены из тимусов новорожденных мышей линии C57BL/6 и охарактеризованы по экспрессии цитокератинов с помощью иммуногистохимического метода (Kasai et al., 1996). Клетки культивировали в среде DMEM (Sigma, США), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Великобритания), 0.1 мг/мл гентамицина (Биолот, Россия), и 0.6 мг/мл глутамина (Биолот, Россия) при 5 % CO<sub>2</sub> и 37 °C.

Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР). Для оценки уровня экспрессии мРНК VEGF и его рецепторов — нейропилина-1 (NRP-1) и тирозин-киназных рецепторов VEGFR1 и VEGFR2 в эпителиальных клетках тимуса мыши, а также для определения в них экспрессии мРНК цитокератинов использовали полуколичественный метод ОТ-ПЦР. Клетки эпителия вносили в 24-луночный планшет ( $3 \cdot 10^5$  кл. на лунку) на 24 ч до образования конфлюэнтного монослоя. Затем клетки культивировали 24 ч с различными факторами. Общую РНК выделяли с помощью реактива TRI (Sigma, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Условия проведения ОТ с последующей ПЦР и подбор специфических праймеров для выявления VEGF и его рецепторов подробно описаны нами ранее (Степанова и др., 2007). Праймеры для выявления VEGF были подобраны таким образом, что выявлялись все три изоформы цитокина — VEGF<sub>120</sub>, VEGF<sub>164</sub> и VEGF<sub>188</sub>. Для выявления цитокератинов использовали следующие праймеры: для кератина 5 (KER5) — прямой 5'-aacggggggagctggctctaa-3' и обратный 5'-gccaaggccactgc-3' (размер продукта 290 пар нуклеотидов); для кератина 8 (KER8) — прямой 5'-aggcagctgcgcgactacca-3' и обратный 5'-aaccacaggccttgggtgc-3' (285 пар нуклеотидов) при 34 циклах амплификации. В качестве гена сравнения был выбран β-актин, для выявления которого использовали прямой праймер 5'-atggatgacgatatcgct-3' и обратный 5'-atgaggtagtcgtcagg-3' (568 пар нуклеотидов, 20 циклов). Результаты визуализировали по электрофорезу в 1%-ном геле, окрашенном бромистым этидием (ICN, США), с последующим фотографированием иdensитометрией полос в геле с помощью программы ScionImage (Adobe, США).

**Иммуноферментный анализ (ИФА).** Количественное содержание VEGF в надосадках 24-часовых культур клеток эпителия определяли с помощью ИФА, используя набор для определения мышиного VEGF (R&D

Systems, США). В отдельных экспериментах концентрацию VEGF соотносили с содержанием общего белка в клетках, которые лизировали добавлением 200 мкл 0.1 N NaOH на 1 лунку в течение 1 ч при 37 °C. Белок определяли с помощью реактива Брэдфорда (Bio-Rad, США). Для построения стандартной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

**Проточная цитофлуориметрия.** Экспрессию NRP-1 на поверхности эпителиальных клеток и тимоцитов интактных мышей определяли на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США) с помощью козьих антител против NRP-1 мыши, меченных карбоксифлуоресцеином (R&D Systems, США), и соответствующего изотипического контроля. Клетки эпителия отделяли от дна флякона аккутазой (Sigma, США), после чего отмывали и инкубировали с антителами. Для каждого из образцов проанализировано не менее 15 000 одиночных клеток. Обработку данных проводили при помощи программы Kaluza(tm) v.1.3 (Beckman Coulter, США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента.

**Использованные реактивы:** адренокортикотропный гормон (АКТГ) и лептин человека, дексаметазон (Sigma, США); цитокины мыши: KGF, TNF-α, семафорин3A (Sem3A), SDF-1α, IL-7, IL-1β и IL-6 (R&D Systems, США).

## Результаты

Разработка модели для изучения синтеза VEGF *in vitro*. В предварительных исследованиях нам необходимо было подтвердить сохранность экспрессии маркеров, характеризующих культивируемые клетки эпителия по их принадлежности к кортикальному (KER5-KER8<sup>+</sup>) или медуллярному (KER5<sup>+</sup>KER8<sup>-</sup>) типу эпителия. Для этого мы исследовали их цитокератиновый профиль с помощью метода ОТ-ПЦР. Как показано на рис. 1, сTEC1-2 экспрессировали преимущественно мРНК KER-8, а mTEC3-10 — мРНК KER-5, что соответствует данным литературы (Kasai et al., 1996).

Затем мы исследовали, способны ли изучаемые нами клеточные линии к синтезу VEGF. С помощью метода ОТ-ПЦР обнаружили, что обе линии экспрессируют мРНК VEGF, причем экспрессия мРНК в кортикальных клетках была значительно выше, чем в медуллярных (рис. 1). Эти данные были подтверждены с помощью ИФА при исследовании продукции VEGF. Было установлено, что в надосадках 24-часовых клеточных культур клеток mTEC3-10 содержится  $76.61 \pm 5.10$  пг/мл, а в надосадках сTEC1-2 значительно больше —  $2.60 \pm 0.16$  нг/мл VEGF.

**Влияние KGF на синтез и продукцию VEGF.** В основной части работы мы изучали регуляцию синтеза VEGF в клетках эпителия тимуса с помощью различных веществ, включающих в себя цитокины и гормоны. В качестве основного объекта исследования был выбран фактор роста кератиноцитов (KGF). Он синтезируется тимоцитами, а на эпителиальных клетках тимуса для него имеется специфический receptor — FGFR2IIIb (Erickson et al., 2002; Min et al., 2007; Rossi et al., 2007). Поскольку показано, что KGF стимулирует в клетках эпителия тимуса синтез ряда ростовых и дифференционных факторов (Rossi et al., 2007), мы предположили, что KGF также может активировать в них и синтез VEGF.

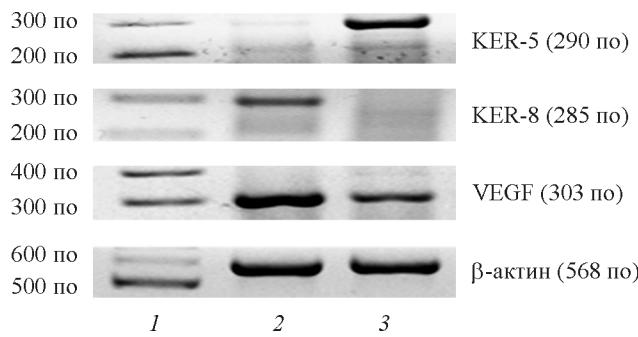


Рис. 1. Экспрессия мРНК цитокератинов (KER-5, KER-8) и цитокина VEGF в клетках кортикального (cTEC1-2) и медуллярного (mTEC3-10) эпителия тимуса. Результаты ОТ-ПЦР.

Дорожки: 1 — маркер молекулярной массы, 2 — клетки cTEC1-2, 3 — клетки mTEC3-10; здесь и далее по — пары оснований.

Исследование синтеза и продукции VEGF под действием 100 нг/мл KGF проводили с применением двух методов — ИФА и ОТ-ПЦР (рис. 2). С помощью реакции ОТ-ПЦР было показано, что при добавлении KGF происходит уменьшение экспрессии мРНК VEGF в кортикальных эпителиальных клетках и, напротив, усиление синтеза мРНК VEGF в медуллярных клетках (рис. 2, *в—е*). Полученные данные были частично подтверждены с помощью ИФА (рис. 2, *а, б*), по данным которого добавление KGF увеличивало содержание VEGF в супернатантах клеток mTEC3-10 и не оказывало влияния на концентрацию VEGF в надосадочной жидкости клеток cTEC1-2.

Поскольку известно, что KGF стимулирует пролиферацию эпителиальных клеток (Rossi et al., 2007), необходимо было подтвердить, что увеличение содержания VEGF в супернатантах медуллярных клеток связано с увеличением его продукции, а не с увеличением числа клеток. Для этого мы провели дополнительный эксперимент, в котором разрушили монослой клеток и оценили продукцию VEGF в пересчете на общий белок. Полученные данные подтвердили способность KGF повышать продукцию VEGF в медуллярных клетках:  $82.02 \pm 4.78$  пг на 1 мг белка в контроле и  $254.65 \pm 25.28$  при добавлении KGF ( $n = 6$ ,  $P < 0.001$ ). В кортикальных клетках изменения продукции VEGF не обнаружено:  $2.44 \pm 0.29$  нг на 1 мг белка в контроле и  $2.89 \pm 0.46$  при инкубации с KGF ( $n = 6$ ), что подтверждает данные, полученные без расчета на содержание белка.

Влияние дексаметазона на синтез и продукцию VEGF. В качестве другого фактора нами был выбран препарат дексаметазон, который является синтетическим аналогом естественного гормона кортикоэстера на у мышей и кортизола у человека. Известно, что глюкокортикоидные гормоны в небольшом количестве синтезируются локально в тимусе эпителиальными клетками и самими тимоцитами (Zilberman et al., 2004; Traves et al., 2011). В физиологических условиях глюкокортикоиды участвуют в индукции апоптоза и негативной селекции (Cohen et al., 2009). В экспериментах дексаметазон широко применяется как индуктор апоптоза тимоцитов *in vitro* и как фактор, вызывающий инволюцию тимуса при введении в организм в фармакологических дозах (Alpdogan

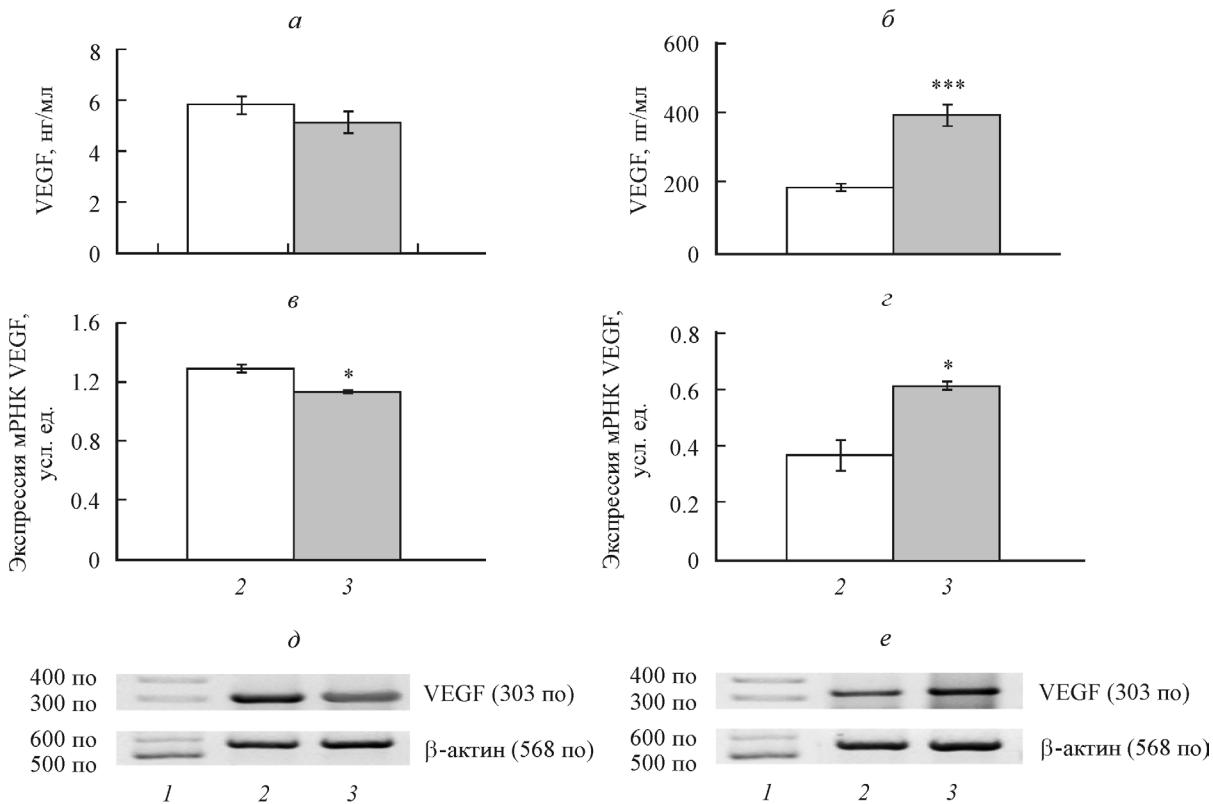


Рис. 2. Влияние KGF (100 нг/мл) на продукцию и синтез VEGF клетками cTEC1-2 (а, в, д) и mTEC3-10 (б, г, е). а, б — содержание VEGF (нг/мл для cTEC1-2 и пг/мл для mTEC3-10) в 24-часовых супернатантах клеток (ИФА;  $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); в, г — экспрессия мРНК VEGF в клетках эпителия, нормализованная по β-актину (ОТ-ПЦР), усл. ед. ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); столбы: 2 — контроль, 3 — в присутствии KGF; д, е — фотографии гелей одного из репрезентативных экспериментов: дорожка 1 — маркер молекулярной массы, 2 — контроль, 3 — в присутствии KGF. Здесь и далее: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

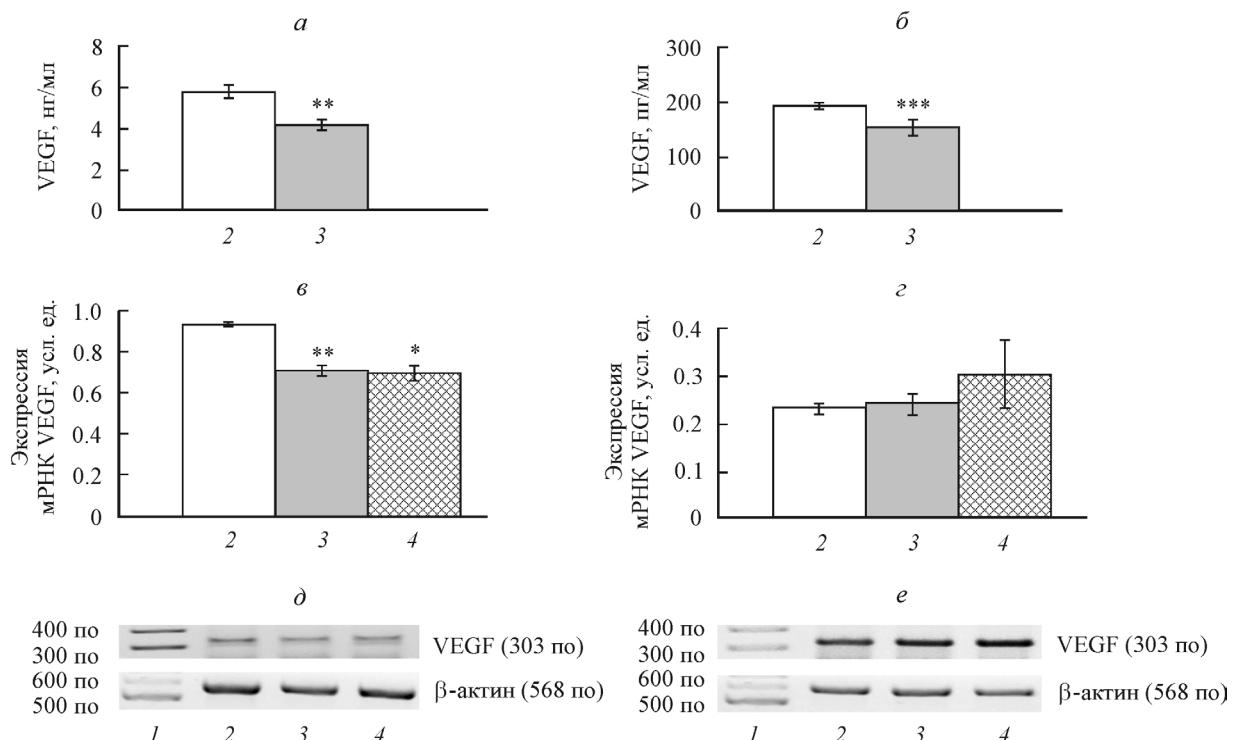


Рис. 3. Влияние дексаметазона на продукцию и синтез VEGF клетками cTEC1-2 (a, в, д) и mTEC3-10 (б, г, е).

a, б — содержание VEGF в 24-часовых супернатантах клеточных культур (ИФА), нг/мл (a) и пг/мл (б), в, г — экспрессия мРНК VEGF в клетках эпителия, нормализованная по β-актину (ОТ-ПЦР), усл. ед.; столбцы: 2 — контроль, 3, 4 — в присутствии 100 и 1000 нМ дексаметазона соответственно. д, е — фотографии гелей одного из репрезентативных экспериментов: дорожка 1 — маркер молекулярной массы, 2 — контроль, 3, 4 — в присутствии 100 и 1000 нМ дексаметазона соответственно. Показаны средние значения и их ошибки для n = 6 (a, б) и n = 4 (в, г).

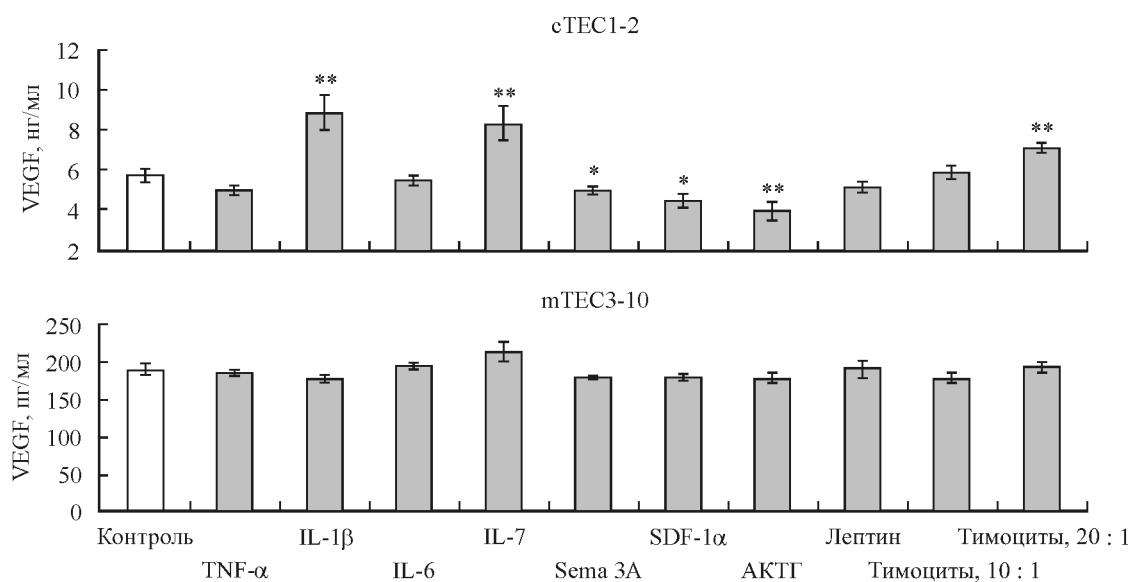


Рис. 4. Влияние различных факторов, а также тимоцитов на продукцию VEGF клетками линий cTEC1-2 и mTEC3-10 эпителия тимуса по данным ИФА.

По вертикали — содержание VEGF в супернатантах клеток cTEC1-2 (нг/мл) и mTEC3-10 (пг/мл). Клетки культивировали 24 ч в присутствии TNF- $\alpha$  (10 нг/мл), IL-1 $\beta$  (10 нг/мл), IL-6 (100 нг/мл), IL-7 (10 нг/мл), Sema3A (100 нг/мл), SDF-1 $\alpha$  (200 нг/мл), АКТГ (30 нМ), лептина (10 нМ) или тимоцитов интактных мышей СЗНА в соотношении с клетками эпителия 10 : 1 или 20 : 1. Показаны средние значения и их ошибки (n = 4—10).

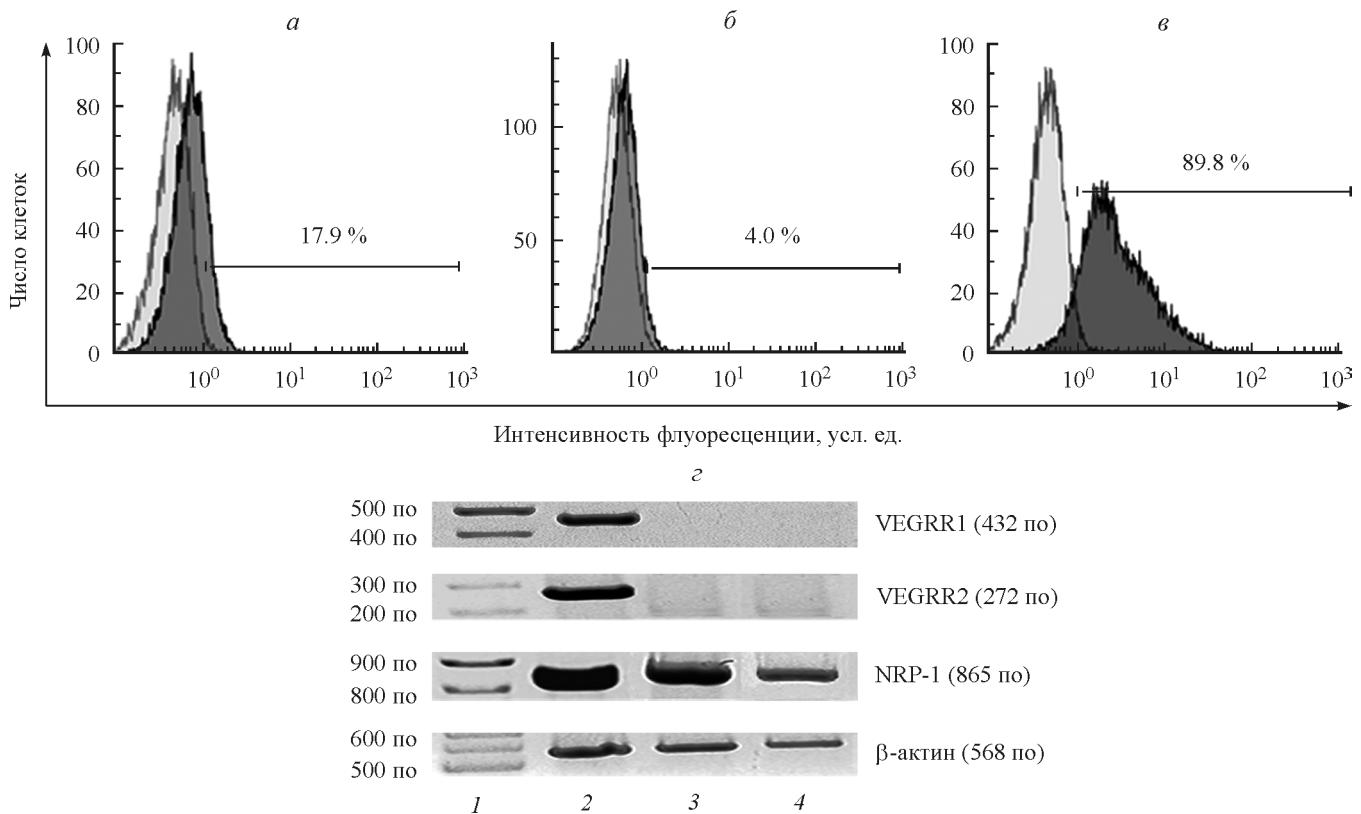


Рис. 5. Экспрессия рецепторов VEGF: мембранный экспрессия NRP-1 клетками сTEC1-2 (а), mTEC3-10 (б) и тимоцитами мыши (в) по данным проточной цитометрии, а также экспрессия мРНК VEGFR1, VEGFR2 и NRP-1 (в) по данным ОТ-ПЦР. а—в: светло-серый цвет — антитела изотипического контроля, темно-серый цвет — антитела против NRP-1; выделена область NRP-1<sup>+</sup>-клеток и указано их содержание в %. в — экспрессия мРНК VEGFR1, VEGFR2 и Nrp-1: дорожка 1 — маркер молекулярной массы, 2 — ткань легкого мыши, 3 — клетки сTEC1-2, 4 — клетки mTEC3-10.

et al., 2006). В данной работе мы использовали две концентрации дексаметазона, одна из которых (100 нМ) соответствует патофизиологической концентрации кортикостерона в крови мышей, а другая (1000 нМ) — фармакологической дозе.

По данным ИФА, воздействие 100 нМ дексаметазона в течение 24 ч уменьшало содержание VEGF в супернатантах обеих исследованных клеточных линий (рис. 3, а, б). При изучении влияния дексаметазона на синтез мРНК VEGF с помощью ОТ-ПЦР ингибирующее действие было выявлено только в кортикальных клетках, в то время как в медуллярных клетках изменений не наблюдалось (рис. 3, в—е). При увеличении дозы дексаметазона до 1000 нМ подавление экспрессии мРНК VEGF наблюдалось также только в кортикальных клетках эпителия.

Влияние других цитокинов, гормонов, а также тимоцитов на продукцию VEGF. Известно, что к ряду медиаторов, синтезируемых в тимусе и играющих существенную роль в функционировании вилочковой железы, относятся такие цитокины, как TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-7, SDF-1 (Yarilin, Belyakov, 2004) и Sema3A (Garcia et al., 2012), а также гормональные факторы — лептин (Gruver, Sempowski, 2008) и АКТГ (Talaberg et al., 2015). Из перечисленных препаратов в наших исследованиях IL-7 и IL-1 $\beta$  стимулировали, Sema3A, SDF-1 $\alpha$  и АКТГ подавляли, а TNF- $\alpha$ , IL-6 и лептин не влияли на продукцию VEGF в кортикальных клетках эпителия тимуса при действии в течение 24 ч. При этом аналогичных эффектов на медуллярных клетках не обнаружили (рис. 4).

Кроме того, было изучено влияние совместного культивирования эпителиальных клеток тимуса с тимоцитами, поскольку в литературе имеются данные о том, что добавление тимоцитов к культуре эпителиальных клеток человека вызывает их активацию и усиление секреции цитокинов (Шарова и др., 2008). В наших экспериментах совместное культивирование тимоцитов взрослых интактных мышей с эпителиальными клетками тимуса в течение 24 ч в соотношении 10 : 1 не влияло, а в соотношении 20 : 1 стимулировало продукцию VEGF кортикальными клетками, не влияя при этом на медуллярные (рис. 4).

Способность клеточных линий к синтезу рецепторов VEGF. Мы предположили, что функционирование VEGF в тимусе может не ограничиваться его влиянием только на эндотелиальные клетки и что эпителиальные клетки также могут служить для него мишенью по типу аутокринной регуляции. Для проверки этой гипотезы мы исследовали способность эпителиальных клеток экспрессировать мРНК рецепторов VEGF, а именно VEGFR1 и VEGFR2 и корецептора NRP-1.

Используя ОТ-ПЦР, мы не обнаружили экспрессии мРНК VEGFR1 и VEGFR2 в кортикальных и медуллярных клетках в пределах чувствительности данного метода. На клетках сTEC1-2 и mTEC3-10 была показана экспрессия мРНК только NRP-1 (рис. 5, в).

При исследовании поверхностной экспрессии NRP-1 с помощью проточной цитофлуориметрии среди клеток эпителия было выявлено лишь небольшое количество NRP-1<sup>+</sup>-клеток, а именно: среди клеток линии сTEC1-2 —

17.9, а среди клеток mTEC3-10 — 4.0 %, что было значительно ниже по сравнению с тимоцитами, у которых доля NRP-1<sup>+</sup>-клеток составила 89.8 % (рис. 5, *a—c*).

## Обсуждение

Тимус — центральный орган иммунной системы, в котором происходит созревание Т-лимфоцитов. При возрастной, а также акцидентальной инволюции тимуса, вызванной различными факторами, нарушается тимопоэз, что является причиной развития Т-клеточного иммунодефицита. Поэтому разработка способов, направленных на восстановление нормального созревания Т-лимфоцитов, является актуальной задачей.

Механизмы инволюции тимуса недостаточно ясны. Существует гипотеза о том, что в основе этого процесса лежит подавление функционирования тимусного эпителия, который должен обеспечивать развивающиеся тимоциты необходимыми ростовыми факторами (Carrio et al., 2009). Действительно, многие авторы отмечают структурные и функциональные повреждения эпителиальных клеток при развитии как возрастной (Min et al., 2007), так и острой инволюции, вызванной облучением (Adkins et al., 1988), введением циклофосфана (Park et al., 2007) или дексаметазона (Van Vliet et al., 1986). В качестве одного из таких нарушений рассматривается снижение содержания VEGF в тимусе человека (Федорова и др., 2009) и собак (Agreste et al., 2015) при возрастной инволюции тимуса. Аналогичные изменения наблюдали при атрофии вилочковой железы, вызванной опухолевым ростом у мышей (Carrio et al., 2009).

В настоящем исследовании впервые охарактеризованы две клеточные линии эпителия тимуса мыши — кортикального (линия cTEC1-2) и медуллярного (линия mTEC3-10) — по их способности к синтезу и продукции VEGF. Обе линии продуцировали VEGF, но в разном количестве: концентрация этого фактора в 24-часовом суспернатанте была примерно в 30 раз выше у клеток cTEC1-2, чем у клеток mTEC3-10. Полученные результаты согласуются с данными Мюллера и соавторов, в работе которых кортикальные клетки эпителия фетального тимуса синтезировали VEGF в 10 раз больше, чем медуллярные (Muller et al., 2005).

В литературе описан ряд способов активации эпителиального компартмента в тимусе. Так, было показано усиление синтеза VEGF в эпителиальных клетках тимуса у мышей с помощью фактора роста нервов (NGF) при восстановлении этого органа после введения циклофосфамида у мышей (Park et al., 2007), а также путем введение ростового фактора гепатоцитов (HGF) животным с опухолью (Carrio et al., 2009). Влияние KGF на синтез VEGF в тимусе не изучали, но имеются данные о том, что KGF активирует этот процесс в опухолевых клетках (Narita et al., 2009).

Между тем KGF является наиболее перспективным препаратом для восстановления тимуса, поскольку он разрешен к медицинскому применению для лечения последствий облучения (Berger et al., 2006). Он успешно используется в эксперименте для восстановления тимопоэза после введения дексаметазона, циклофосфана или облучения (Alpdogan et al., 2006). По данным литературы, механизм действия KGF заключается в стимуляции пролиферации тимусного эпителия и его активации (Rossi et al., 2007), что создает дополнительные ниши для разви-

тия тимоцитов и стимулирует их созревание (Min et al., 2007).

В настоящем исследовании впервые показано, что KGF стимулировал синтез и продукцию VEGF клетками линии медуллярного эпителия мыши, но при этом не оказывал аналогичного действия на кортикальные клетки и даже подавлял в них экспрессию мРНК VEGF. Эти данные не вполне согласуются с результатами, полученными *in vivo*, которые свидетельствуют об усилении пролиферации и активации как кортикального, так и медуллярного эпителия при введении KGF животным (Rossi et al., 2007).

Указанные расхождения можно объяснить тем, что упомянутые авторы исследовали взрослых мышей, а в наших экспериментах использованы клеточные линии, полученные от новорожденных животных (Kasai, Mizuochi, 2007). Между этими объектами имеются существенные различия по строению сосудистой сети вилочковой железы. В раннем периоде (первая неделя жизни мышей) идет процесс созревания сосудистой сети тимуса, который зависит от локального синтеза VEGF. Позднее эта связь утрачивается, а синтез VEGF в эпителии тимуса значительно снижается. Так, содержание VEGF в строме неонатального тимуса мышей C57BL/6J составляет 88.53 пг на 1 мг белка, а у взрослых мышей — всего 29.90 (Cuddihy et al., 2009).

В наших экспериментах клетки кортикального эпителия cTEC1-2 продуцировали очень высокие концентрации VEGF (нанограммы), что соответствует их неонатальному происхождению. Логично допустить, что воздействие KGF на эпителий тимуса в раннем возрасте и у взрослых животных может существенно различаться. Наши данные больше согласуются с результатами, полученными на фетальном эпителии тимуса, свидетельствующими, что KGF вызывает экспансию медуллярного компартмента и одновременно подавляет функции кортикального эпителия (Erickson et al., 2002).

При исследовании влияния дексаметазона на VEGF нами также обнаружены различия между кортикальными и медуллярными клетками. Так, дексаметазон ингибировал синтез мРНК VEGF в клетках cTEC1-2 и не влиял на этот показатель в клетках mTEC3-10. Эти факты согласуются с результатами других авторов, которые показали, что введение дексаметазона мышам даже в больших дозах не влияет на морфологические характеристики медуллярных эпителиальных клеток, но при этом вызывает значительные повреждения в кортикальном эпителии тимуса (Van Vliet et al., 1986).

Влияние дексаметазона на синтез VEGF в клетках эпителия тимуса не изучали, но по данным литературы известно, что дексаметазон подавляет синтез VEGF в клетках костного мозга и ткани легкого (Guzman-Morales et al., 2009; Hegeman et al., 2013). Обнаруженная нами способность дексаметазона ингибировать продукцию VEGF в эпителиальных клетках тимуса представляет собой новую характеристику хорошо известного препарата. Можно предположить, что дексаметазон будет также проявлять свои антиangiогенные свойства в тимусе и при введении в организм, оказывая этим дополнительное негативное воздействие на иммунную систему.

Кроме того, мы изучили продукцию VEGF в клетках cTEC1-2 и mTEC3-10 под действием ряда цитокинов и гормонов. Было показано, что IL-7 и IL-1 $\beta$  стимулировали, Sema3A, SDF-1 и АКТГ ингибировали, а TNF- $\alpha$ , IL-6 и лептин не влияли на продукцию VEGF, причем все перечисленные эффекты касались только кортикальных клеток и не выявлялись на медуллярных. Добавление ти-

моцитов также стимулировало продукцию VEGF только в кортикальных эпителиальных клетках.

Влияние данных факторов на продукцию VEGF в клетках эпителия тимуса было изучено нами впервые. Вместе с тем влияние различных цитокинов и гормонов на экспрессию VEGF в других клетках хорошо изучено. Так, известно, что провоспалительные цитокины (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и IL-6), а также SDF-1 и АКТГ стимулируют синтез VEGF в различных клетках организма (Shiffren et al., 1998; Neuhaus et al., 2003; Roskoski, 2007). Результаты наших экспериментов совпадают с перечисленными данными только по стимулирующему эффекту IL-1 $\beta$ , в то время как характер влияния других факторов различается. Существует точка зрения о том, что цитокины с хорошо охарактеризованной регуляторной функцией на периферии выполняют в тимусе совсем другую роль и формируют так называемую малую цитокиновую сеть (Yarilin, Belyakov, 2004).

При рассмотрении роли VEGF в тимусе логично допустить, что этот фактор может действовать не только на эндотелиальные, но также и на любые другие клетки, имеющие к нему рецепторы. Известно, что тимоциты не могут являться мишенью для действия VEGF, так как в них отсутствуют рецепторы VEGFR1 и VEGFR2 и имеется только NRP-1 (Степанова и др., 2007; Corbel et al., 2007; Cuddihy et al., 2009).

В настоящем исследовании был поставлен вопрос о том, не являются ли сами эпителиальные клетки объектом действия этого фактора. Поскольку основных тирозин-киназных рецепторов VEGFR1 и VEGFR2 нами не выявлено, а NRP-1, по данным литературы, неспособен проводить сигнал самостоятельно (Ferrara et al., 2003), следует полагать, что эпителиальные клетки не могут выступать в качестве мишени для действия VEGF. Полученные нами результаты подтверждают данные других авторов о низкой экспрессии VEGFR2 в эпителиальных клетках неонatalного тимуса (11.6 %) и практических полном ее отсутствии (1 %) у взрослых мышей (Cuddihy et al., 2009), что также справедливо и в отношении NRP-1 (Corbel et al., 2007).

Однако следует заметить, что паттерны экспрессии рецепторов VEGF эпителия тимуса у мышей и человека существенным образом различаются. У людей в отличие от мыши все рецепторы обнаружены. Так, с помощью иммуногистохимии показано присутствие VEGFR1 и VEGFR2 на медуллярном эпителии (Cimpean et al., 2008), а с помощью ОТ-ПЦР выявлена экспрессия мРНК NRP-1 в эпителиальных клетках тимуса человека (Lepelletier et al., 2007). Наличие рецепторов указывает на возможность существования у человека регуляторных функций VEGF в отношении не только эндотелиальных, но и эпителиальных клеток тимуса. Что же касается мышей, то полученные нами данные в совокупности с результатами других исследователей (Muller et al., 2005; Park et al., 2007; Cuddihy et al., 2009) позволяют заключить, что основной мишенью действия VEGF, производимого эпителиальными клетками тимуса, являются эндотелиальные клетки.

Настоящее исследование посвящено малоизученному вопросу взаимодействия между эпителиальной и сосудистой составляющими вилочковой железы и способствует лучшему пониманию функциональной роли внутритимусного микроокружения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-06150).

## Список литературы

- Степанова О. И., Крылов А. В., Людино В. И., Киселева Е. П. 2007. Экспрессия генов VEGF-A и VEGF-C и их рецепторов в лимфоцитах и макрофагах мышей. Биохимия. 72 (11) : 1468—1473. (Stepanova O. I., Krylov A. V., Lioudyno V. I., Kisselleva E. P. 2007. Gene expression of VEGF-A, VEGF-C, and their receptors in murine lymphocytes and macrophages. Biochemistry (Moscow). 72 (11) : 1194—1198.)
- Федорова Е. С., Полякова В. О., Коновалов С. С., Кветной И. М. 2009. Экспрессия серотонина и фактора роста сосудов (VEGF) в тимусе человека при возрастной инволюции. Успехи геронтол. 22 (1) : 167—171. (Fedorova E. S., Polyakova V. O., Konovalov S. S., Kvetnaya I. M. 2009. Expression of serotonin and vessel endothelial growth factor (VEGF) in human thymus in aging involution. Adv. Gerontol. 22 (1) : 167—171.)
- Шарова Н. И., Донецкова А. Д., Топтыгина А. П., Митин А. Н., Литвина М. М., Бурменская О. В., Трофимов Д. Ю., Сухих Г. Т., Алексеев Л. П., Ярилин А. А. 2008. Экспрессия цитокиновых генов и секреция цитокинов эпителиальными и лимфоидными клетками тимуса человека. Иммунология. 29 (6) : 329—334. (Sharova N. I., Donetskova A. D., Topptygina A. P., Mitin A. N., Litvina M. M., Burmenskaya O. V., Trofimov D. Y., Suhikh G. T., Alekseev L. P., Yarilin A. A. 2008. Expression of cytokine gene and secretion of cytokines by epithelial and lymphoid cells of human thymus. Immunologiya (Russ.). 29 (6) : 329—334.)
- Adkins B., Gandour D., Strober S., Weissman I. 1988. Total lymphoid irradiation leads to transient depletion of the mouse thymic medulla and persistent abnormalities among medullary stromal cells. J. Immunol. 140 : 3373—3379.
- Agreste F. R., Bombonato P. P., Nogueira K., dos Santos A. C., da Cunha Barreto-Vianna A. R., Mendes de Lima E. M. 2015. VEGF system in dog's thymus — temporal expression. Open J. Vet. Med. 5 : 211—217.
- Alpdogan O., Hubbard V. M., Smith O. M., Patel N., Lu S., Goldberg G. L., Gray D. H., Feinman J., Kochman A. A., Eng J. M., Suh D., Muriglan S. J., Boyd R. L., van den Brink M. R. 2006. Keratinocyte growth factor (KGF) is required for postnatal thymic regeneration. Blood. 107 : 2453—2460.
- Berger M. E., Christensen D. M., Lowry P. C., Jones O. W., Wiley A. L. 2006. Medical management of radiation injuries: current approaches. Occup. Med. (Lond.). 56 : 162—172.
- Carrio R., Altman N. H., Lopez D. M. 2009. Downregulation of interleukin-7 and hepatocyte growth factor in the thymic microenvironment is associated with thymus involution in tumor-bearing mice. Cancer Immunol. Immunother. 58 : 2059—2072.
- Cimpean A. M., Raica M., Encica S., Cornea R., Bocan V. 2008. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor A (VEGF), and its receptors (VEGFR1, 2) in normal and pathologic conditions of the human thymus. Ann. Anat. 190 : 238—245.
- Cohen O., Kfir-Erenfeld S., Spokoini R., Zilberman Y., Yefenof E., Sionov R. V. 2009. Nitric oxide cooperates with glucocorticoids in thymic epithelial cell-mediated apoptosis of double positive thymocytes. Int. Immunopharmacol. 21 : 1123—1133.
- Corbel C., Lemarchandell V., Thomas-Vaslin V., Pelus A.-S., Agboton C., Romeo P.-H. 2007. Neuropilin 1 and CD25 co-regulation during early murine thymic differentiation. Develop. Comp. Immunol. 31 : 1082—1094.
- Cuddihy A. R., Ge S., Zhu J., Jang J., Chidgey A., Thurston G., Boyd R., Crooks G. M. 2009. VEGF-mediated cross-talk within the neonatal murine thymus. Blood. 113 : 2723—2731.
- Erickson M., Morkowski S., Lehar S., Gillard G., Beers C., Doolley J., Rubin J., Rudensky A., Farr A. 2002. Regulation of thymic epithelium by keratinocyte growth factor. Blood. 100 : 3269—3278.
- Ferrara N., Gerber H.-P., LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. Nat. Med. 9 : 669—676.
- Garcia F., Lepelletier Y., Smaniotti S., Hadj-Slimane R., Dardeenne M., Hermine O., Savino W. 2012. Inhibitory effect of semaphorin-3A, a known axon guidance molecule, in the human thymocyte migration induced by CXCL12. J. Leukoc. Biol. 91 : 7—13.
- Gruver A. L., Sempowski G. D. 2008. Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. J. Leukoc. Biol. 84 : 915—923.

- Guzman-Morales J., El-Gabalawy H., Pham M. H., Tran-Khanh N., McKee M. D., Wu W., Centola M., Hoemann C. D. 2009. Effect of chitosan particles and dexamethasone on human bone marrow stromal cell osteogenesis and angiogenic factor secretion. *Bone*. 45 : 617—626.
- Hegeman M. A., Hennus M. P., Cobelens P. M., Kavelaars A., Jansen N. J. G., Schiltz M. J., Vugt A. J., Heijnen C. J. 2013. Dexamethasone attenuates VEGF expression and inflammation but not barrier dysfunction in a murine model of ventilator-induced lung injury. *PLoS ONE*. 8 : e57374.
- Kasai M., Hirokawa K., Kejino K., Ogasawara K., Tatsumi M., Hermel E., Monaco J., Mizuochi T. 1996. Difference in antigen presentation pathways between cortical and medullary thymic epithelial cells. *Eur. J. Immunol.* 26 : 2101—2107.
- Kasai M., Mizuochi T. 2007. Culture and characterization of thymic epithelial cell lines. *Methods Mol. Biol.* 380 : 107—123.
- Lepelletier Y., Smaniotti S., Hadj-Slimane R., Villa-Verde D. M. S., Nogueira A. C., Dardenne M., Hermine O., Savino W. 2007. Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104 : 5545—5550.
- Min D., Panoskaltsis-Mortari A., Kuro-O.-M., Hollander G. A., Blazar B. R., Weinberg K. I. 2007. Sustained thymopoiesis and improvement in functional immunity induced by exogenous KGF administration in murine models of aging. *Blood*. 109 : 2529—2537.
- Muller S. M., Terszowski G., Blum C., Haller C., Anquez V., Kuschert S., Cermeliet P., Augustin H. G., Rodewald H.-R. 2005. Gene targeting of VEGF-A in thymus epithelium disrupts thymus blood vessel architecture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102 : 10 587—10 592.
- Narita K., Fujii T., Ishiwata T., Yamamoto T., Kawamoto Y., Kawahara K., Nakazawa N., Naito Z. 2009. Keratinocyte growth factor induces vascular endothelial growth factor-A expression in colorectal cancer cells. *Int. J. Oncol.* 34 : 355—360.
- Neuhaus T., Stier S., Totzke G., Gruenewald E., Fronhoff S., Sachinidis A., Vetter H., Ko Y. D. 2003. Stromal cell-derived factor 1alpha (SDF-1alpha) induces gene-expression of early growth response-1 (Egr-1) and VEGF in human arterial endothelial cells and enhances VEGF induced cell proliferation. *Cell Prolif.* 36 : 75—86.
- Park H.-J., Kim M. N., Kim J.-G., Bae Y.-H., Bae M.-K., Wee H.-J., Kim T.-W., Kim B.-S., Kim J.-B., Bae S.-K., Yoon S. 2007. Up-regulation of VEGF expression by NGF that enhances reparative angiogenesis during thymic regeneration in adult rat. *Biochim. biophys. acta*. 1773 : 1462—1472.
- Roskoski R. 2007. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 62 : 179—213.
- Rossi S., Jeker L., Ueno T., Kuse S., Keller M., Zuklys S., Gudkov A., Takahama Y., Krenger W., Blazar B. A., Hollander G. A. 2007. Keratinocyte growth factor (KGF) enhances postnatal T-cell development via enhancements in proliferation and function of thymic epithelial cells. *Blood*. 109 : 3803—3811.
- Shifren J. L., Mesiano S., Taylor R. N., Ferrara N., Jaffe R. B. 1998. Corticotropin regulates vascular endothelial growth factor expression in human fetal adrenal cortical cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 : 1342—1347.
- Talaber G., Tuckermann J. P., Okret S. 2015. ACTH controls thymocyte homeostasis independent of glucocorticoids. *FASEB J.* 29 : 2526—2534.
- Traves M. D., Gomez-Sanchez C. E., Soma K. K. 2011. Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301 : E11—E24.
- Van Vliet E., Melis M., van Ewijk W. 1986. The influence of dexamethasone treatment on the lymphoid and stromal composition of the mouse thymus: a flow cytometric and immunohistological analysis. *Cell. Immunol.* 103 : 229—240.
- Yarilin A. A., Belyakov I. M. 2004. Cytokines in the thymus: production and biological effects. *Curr. Med. Chem.* 11 : 447—464.
- Yla-Herttuala S., Rissanen T. T., Vajanto I., Hertikainen J. 2007. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J. Amer. Coll. Cardiol.* 49 : 1015—1026.
- Zilberman Y., Zafrir E., Ovadia H., Yefenof E., Guy R., Sionov R. V. 2004. The glucocorticoid receptor mediates the thymic epithelial cell-induced apoptosis of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymic lymphoma cells. *Cell. Immunol.* 227 : 12—23.

Поступила 15 II 2016

## REGULATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) PRODUCTION BY MOUSE THYMIC EPITHELIAL CELL LINES

K. V. Rutto,<sup>1,\*</sup> I. V. Lyamina,<sup>1</sup> I. V. Kudryavtsev,<sup>1,2</sup> E. P. Kisseeleva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute for Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376,  
 and <sup>2</sup> School of Medicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690091;  
 \* e-mail: krispins-90@mail.ru

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is synthesized in small amounts by thymus epithelial cells in adults and plays a role in supporting vascular homeostasis. However its role becomes dramatically important during the process of thymus reparation after involution caused by chemo-, x-ray or hormonal therapy. The aim of the study was to evaluate the influence of different factors on VEGF production by mouse thymic epithelial cells *in vitro*. As a model two cell lines were used: cortical cTEC1-2 and medullar mTEC3-10 cells. These cells were characterized by their ability to synthesize VEGF mRNA and protein as well as by their expression of VEGF receptors. VEGFR1 and VEGFR2 mRNA expression in these cells were absent while NRP-1 mRNA revealed low level of expression. It was shown by ELISA that cTEC1-2 cells produced VEGF about 30 times more than mTEC3-10. When cultivated in the presence of cytokines, hormonal factors or thymocytes, both cell lines responded differently. Introduction of keratinocyte growth factor (KGF) induced VEGF mRNA expression as well as VEGF production in medullar cells but simultaneously down-regulated VEGF mRNA expression in cortical cells. Dexamethasone suppressed mRNA VEGF expression and VEGF production in cortical cells while in medullar cells only VEGF production was reduced. Introduction of IL-7, IL-1 $\beta$  or murine thymocytes increased while addition of Semaphorin 3A, SDF-1 $\alpha$  or ACTH decreased VEGF production by cortical epithelial cells with no influence on medullar cells. We suggest that our data obtained *in vitro* can be used for further development of special programs for directed regulation of VEGF synthesis in the thymus epithelial cells *in vivo*.

**Key words:** thymus, epithelial cells, cTEC1-2, mTEC3-10, VEGF, KGF, dexamethasone, VEGFR1, VEGFR2, NRP-1.