

## НАВИГАЦИОННЫЕ МОЛЕКУЛЫ И ХЕМОКИНЫ В ПРОЦЕССАХ РОСТА И РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ СОСУДОВ

© К. А. Рубина,<sup>1</sup> Е. В. Семина,<sup>1, 2</sup> В. А. Ткачук<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва

<sup>2</sup> РКНПК МЗ РФ, Институт экспериментальной кардиологии, Москва, Россия

E-mail: rkseiniya@mail.ru

В последнее время помимо основных молекул, участвующих в процессах ангиогенеза, таких как факторы роста, цитокины и хемокины, большое внимание уделяется изучению навигационных молекул, которые определяют направление роста вновь формирующихся сосудов (эфрины и их рецепторы, нейропилины и плексины — рецепторы семафоринов, Robo — рецепторы слит-белков, и UNC5B рецепторы, связывающие нетрины, урокиназа и ее рецептор, Т-кадгерин). Навигационные рецепторы играют важную роль в процессах регуляции траектории роста сосудов в эмбриогенезе и при регенерации во взрослом организме. Помимо перечисленных молекул важную роль в процессах ангиогенеза и ремоделирования сосудистой стенки играют матриксные металлопротеиназы (ММР) и сериновые протеазы (урокиназа и плазмин). Нарушения экспрессии или сигнализации с участием вышеперечисленных белков может приводить к развитию различных патологий.

**Ключевые слова:** ангиогенез, навигационные рецепторы, факторы роста, хемокины, Т-кадгерин.

### Введение

Восстановление кровоснабжения поврежденных тканей лежит в основе многих регенеративных процессов. Изучение механизмов регуляции роста кровеносных сосудов необходимо как для разработки современных подходов в регенеративной медицине, так и для создания лекарств, направленных на блокирование процессов ангиогенеза, которые выходят из-под контроля при онкологических и ряде других заболеваний.

Задачей фундаментальной биологии и медицины является изучение фундаментальных основ организации и функционирования органов и тканей, комплексных молекулярно-биологических, клеточных и биохимических механизмов, нарушение работы которых приводит к развитию патологий.

### Навигационные рецепторы и их роль в процессах ангиогенеза

Ангиогенные факторы активируют сосудистые клетки и инициируют рост сосудов, основную роль в специализации ведущих «tip» клеток играет фактор роста эндотелия VEGF (vascular endothelial growth factor), он же определяет поляризацию клетки. Для формирования функционально зрелых сосудов в строго заданном месте в определенное время лишь одна эндотелиальная клетка становится «ведущей», в соседних с ней клетках формируется фенотип «ведомых» клеток

(«stalk» cells). «Ведущая» клетка локализуется на конце растущего сосуда, формирует множественные филоподии, с помощью которых она «тестирует» микроокружение. «Ведущая» эндотелиальная клетка распознает комбинации навигационных сигналов микроокружения и реализует их в виде направленной миграции, формирования и роста сосудов. «Ведущая» клетка мигрирует по градиенту хемоаттрактанта и направляет рост всего сосуда [1]. Основную роль в специализации «ведущих» и «ведомых» клеток играет градиент VEGF. Начальная специализация и дальнейшее поддержание эндотелиальных клеток в состоянии фенотипа «ведущих» или «ведомых» клеток регулируются на уровне Dll4/NOTCH сигнализации [2].

Ангиогенные факторы активируют сосудистые клетки, однако существует целый класс различных по своей структуре навигационных молекул, определяющих траекторию роста вновь формирующихся сосудов [3, 4]. «Ведущие» клетки экспрессируют такие навигационные молекулы, как нейропилины (NRPs) и плексин D1 (PLEXIN-D1), эфрины и рецепторы эфринов (EPH), ROBO4 белки, взаимодействующие со слит-белками (Slit), UNC5B рецептор, связывающий нетрины (netrins). Взаимодействие навигационных рецепторов с лигандами может приводить как к отталкиванию и как следствию к изменению направления роста сосуда, так и наоборот, может вызывать адгезию и служить аттрактивным сигналом для роста сосуда в данном направлении [4]. В основном перечисленные навигационные молекулы опосредуют свои эффекты

через активацию внутриклеточной сигнализации, приводящей к изменению организации цитоскелета клеток или модулированию внутриклеточной сигнализации, которая активируется при связывании VEGF с VEGFR [5]. Известно, что ряд морфогенов, таких как Wnts (wingless-type proteins), Sonic Hedgehog (Shh) и BMP (Bone Morphogenetic Protein), являются аттрактивными или, наоборот, сигналами отталкивания для растущих сосудов [5], однако прямого подтверждения экспрессии этих белков «ведущими» клетками в литературе пока нет.

Нейропилины (NRP1 и NRP2) в эндотелиальных клетках выступают либо как ко-рецепторы VEGFR (VEGFR1, 2, 3) и участвуют в морфогенезе и ветвлении сосудов, либо как рецепторы семафоринов (Sema3), регулируя траекторию роста сосудов за счет отталкивания и подавления миграции эндотелиальных клеток в область с высокой концентрацией Sema3 [1, 4]. Генетические исследования у мышей показали, что формирующиеся в заднем мозге сосуды в отсутствие NRP1 не ветвятся, а сливаются с формированием дефектного сосудистого сплетения; блокирование процесса связывания VEGF с NRP1 препятствует дальнейшему ремоделированию этого сплетения и формированию функционально зрелой сосудистой сети [6]. Дефекты ветвления сосудов и образование aberrантной сосудистой сети в отсутствие NRP1 вызваны нарушением формирования латеральных филоподий, которые важны для изменения направления миграции «tip» клетки в момент поворота и слияния растущих по направлению друг к другу сосудов [6].

Добавление антител к NRP1, которые блокируют связывание с VEGF, но не влияют на связывание с Sema3, не имеют существенного значения для морфогенеза сосудов в эмбриогенезе [6]. Однако Sema3 играет важную роль при опухолевом росте и является перспективной мишенью для подавления опухолевого неопластического ангиогенеза и метастазирования [3, 4].

Семафорины в сосудистой системе представлены как мембранно-связанными белками, так и секретируемыми. Семафорины помимо нейропилинов могут связываться с плексинами. Потеря экспрессии плексина D1 у мышей приводит к ошибкам навигации и формированию дефектной сосудистой сети, поскольку в отсутствие рецептора плексина D1 эндотелиальные клетки прорастающих сосудов не распознают сигнала отталкивания микроокружения — SEMA3E. Для многих семафоринов, таких как SEMA3A, SEMA3B, SEMA3D, SEMA3F и SEMA4A, описан антиангиогенный эффект при опухолевом росте. Однако известно, что семафорины SEMA3C и SEMA4D, наоборот, стимулируют опухолевый ангиогенез [3, 4].

Эфрины и их рецепторы за счет контактного взаимодействия между клетками и сигнализацией, которая при этом возникает, участвуют в формировании границ между сосудистыми структурами в эмбриогенезе. В «ведущих» клетках сигнализация, которая активируется при взаимодействии эфрина-B2 с рецептором, вызывает интернализацию VEGFR-2, последующий сигнальный каскад и формирование филоподий. Экспрессия эфрина-B2 также важна для привлечения эндо-

телиальных предшественников из костного мозга и рекрутировании муральных клеток в процессе стабилизации сосудов [3, 4]. Известно, что на ранних стадиях эмбриогенеза взаимодействие эфрина-B2 с EPHB4 также определяет артериовенозную дифференцировку сосудов. При васкулогенезе в первичном сосудистом сплетении та часть клеток, которая экспрессирует эфрин-B2, будет дифференцироваться в артериальные эндотелиальные клетки, а клетки, экспрессирующие EPHB4, — в венозные [7]. Взаимодействие эфринов с рецепторами, как правило, вызывает отталкивание, поэтому две популяции эндотелиальных клеток при морфогенезе сосудистой системы не смешиваются, обособляются друг от друга и мигрирует сепаратно.

При опухолевом росте в целом EPHB4 играет проангиогенную роль, что позволяет рассматривать его как потенциальную терапевтическую мишень для антиангиогенной терапии. Другие эфрины, EPHA2 и эфрин-A1, важны для роста и созревания сосудов. Было обнаружено, что экспрессия эфрина-A1 повышается при применении антиангиогенной терапии с использованием блокаторов VEGF. При этом развитие резистентности связывают с увеличением экспрессии эфрина-A1 [3].

### Цитокины и хемокины в процессах ангиогенеза

К важным регуляторам процессов ангиогенеза в норме и при патологии относят цитокины.

**Цитокины.** Цитокины включают интерфероны, колониестимулирующие факторы, хемокины, трансформирующие ростовые факторы (TGF), фактор некроза опухолей (TNF $\alpha$ ), интерлейкины и некоторые другие эндогенные медиаторы. Цитокины по своему биологическому действию делятся на провоспалительные (интерлейкины 1, 2, 6, 8 и др., TNF $\alpha$ , интерферон INF $\gamma$ ), противовоспалительные (интерлейкины 4, 10 и др., TGF $\beta$ ) и регуляторы клеточного и гуморального иммунитета. Цитокины влияют на межклеточные взаимодействия, регулируют выживаемость клеток, стимулируют или подавляют их пролиферацию, дифференцировку, функциональную активность и апоптоз, а также координируют и обеспечивают согласованность действий иммунной, эндокринной и нервной систем в нормальных условиях и в ответ на патологические воздействия [7—13]. Основными продуцентами цитокинов являются лимфоциты, их также секретируют макрофаги, гранулоциты, ретикулярные фибробласты, эндотелиальные клетки и другие типы клеток. Провоспалительные интерлейкины IL-1, IL-6, IL-15, IL-18 и IL-17 и ряд других цитокинов обладают способностью стимулировать ангиогенез. В модельных экспериментах *in vivo* и *in vitro* было показано, что IL-1, IL-8, IL-15, IL-18 стимулируют выживание и пролиферацию эндотелиальных клеток, формирование ими капиллярноподобных трубочек, роста сосудов на Матригеле [13]. В зависимости от экспериментальных условий IL-6 может как стимулировать, так и ингибировать ангиогенез. Экспрессия ряда провоспалительных цито-

кинов оказывается повышена при аутоиммунных заболеваниях и вносит свой вклад в развитие заболевания. Повышенное содержание IL-1, IL-6, IL-15, IL-18 и IL-17, а также G-CSF (гранулоцит колониестимулирующий фактор), GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) и oncostatinM обнаруживается при ревматоидном артрите [8]. Некоторые цитокины за счет своих ангиогенных свойств способствуют опухолевому росту; так, IL-17 стимулирует CXCR2-зависимую васкуляризацию немелкоклеточного рака легкого у SCID мышей [14]. Другие цитокины, такие как IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-12 и LIF (фактор ингибирования лейкемии), опосредованно способны ингибировать ангиогенез за счет подавления секреции клетками ангиогенных факторов роста, хемокинов и цитокинов [15]. Например, IL-4 блокирует ангиогенные эффекты TNF $\alpha$  и IL-1 [15], а IL-12 блокирует ангиогенез за счет индукции экспрессии IFN- $\gamma$  и IP-10/CXCL10, который обладает ингибирующими ангиогенез свойствами [16].

**Хемокины.** Хемокины являются уникальным семейством цитокинов и представляют собой низкомолекулярные (8—10 кДа) гепарин-связывающие белки, о функции которых долгое время было известно, что они являются факторами, привлекающими лейкоциты в зону воспаления [17]. В настоящее время считается, что хемокины играют важную роль в регуляции ангиогенеза как в норме, так и при патологии. Семейство хемокинов включает как проангиогенные, так и антиангиогенные молекулы. В основе стимуляции ангиогенеза с участием хемокинов лежит рекрутирование проангиогенных гематопозитических и иммунных клеток, стромальных клеток и эндотелиальных клеток-предшественников, индукция миграции эндотелиальных клеток и формирования капилляров; хемокины также модулируют сигнализацию от рецепторов факторов роста, таких как VEGF и FGF [18]. Хемокины, ингибиторы ангиогенеза, связываясь с рецепторами на эндотелиальных клетках, вызывают их апоптоз или регрессию сосудов. Эти хемокины также могут формировать комплексы с факторами роста и тем самым препятствовать их связыванию со своими рецепторами, ингибировать тирозин-киназную сигнализацию от рецепторов факторов роста и вызывать хемотаксис Т-клеток, которые продуцируют ингибиторы ангиогенеза, в том числе и секрецию самих антиангиогенных хемокинов [17].

На сегодняшний день у человека известно около 20 рецепторов хемокинов и 50 лигандов, которые условно разделены на 4 подсемейства в зависимости от структуры (С, СС, СХС, СХ<sub>3</sub>С): так, СХС хемокины между первым и вторым цистеинами на N-конце содержат неконсервативную аминокислоту (X); СС хемокины, самое большое подсемейство, содержат два последовательных цистеина; С хемокины содержат один цистеин и представлены единственным хемокином lymphotactin (XCL1 и XCL2), СХ<sub>3</sub>С хемокины между цистеинами содержат 3 неконсервативные аминокислоты, имеют единственного представителя Fractalkine, который является уникальным мембранно-связанным хемокином [18, 19]. Далее, СХС хемокины разделяют на 2 подгруппы: ELR-позитивные хе-

мокины (ELR+) и ELR-негативные хемокины (ELR-), в зависимости от наличия консервативной аминокислотной последовательности (Glu-Leu-Arg) перед первым цистеином на N-конце. Наличие ELR определяет специфичность связывания с рецептором и биологическую функцию: ELR+ хемокины проангиогенны, ELR-хемокины — антиангиогенны [18].

Связывание хемокинов с GPCR рецепторами приводит к замене ГДФ на ГТФ в  $\alpha$ -субъединице рецептора, диссоциации гетеротримерного белкового комплекса ( $G\alpha\beta\gamma$ ) на  $\alpha$  и  $\beta\gamma$  субъединицы, которые в свою очередь активируют фосфолипазу С ( $C\beta 1$  и  $C\beta 2$ ), вызывают гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата ( $PIP_2$ ), что приводит к образованию инозитолтрифосфата ( $IP_3$ ) и диацилглицерола (DAG) с последующим увеличением содержания внутриклеточного кальция за счет его выхода из эндоплазматического ретикула в цитоплазму [20, 21]. Сами хемокиновые рецепторы не обладают тирозинкиназной активностью, однако в результате кросс-тока с другими рецепторами могут стимулировать фосфорилирование белков цитоскелета p130 Cas и paxillin [22] и активировать киназу фокальных адгезий (FAK), а также сигнальные пути Ras/Raf/MEK/JNK/p38/ERK1/ERK2 и сигнализацию с участием фосфоинозитид-3-киназы ( $PI3Kinase$ )/AKT/mTOR с последующей активацией транскрипционных факторов и экспрессией генов [16, 20, 23—25]. Кроме того, имеются данные о том, что внутриклеточная сигнализация с участием рецепторов, сопряженных с G-белками, приводит к активации Rho и Rac сигнальных путей, полимеризации актина, сборке фокальных контактов и миграции клеток [26].

**Хемокины ингибиторы ангиогенеза.** В физиологических условиях при формировании необходимого количества сосудов ангиогенез прекращается за счет индукции соответствующих ингибиторов. При патологии, например, при хроническом воспалении, опухолевом росте и других заболеваниях, этот баланс нарушается, что приводит к неконтролируемому ангиогенезу с формированием aberrантных и нефункциональных сосудов. В норме в ответ на стимуляцию ангиогенеза факторами роста и ангиогенными хемокинами параллельно начинает продуцироваться определенный спектр антиангиогенных хемокинов [27]. Среди них интерферон (IFN)-индуцируемые ELR-хемокины СХС подсемейства, которые являются важными ингибиторами ангиогенеза, включая CXCL4/фактор тромбоцитов 4 (PF4), CXCL10/интерферон- $\gamma$ -индуцируемый белок 10 (IP-10), CXCL9/ $\gamma$ -индуцируемый монокин (MIG), CXCL11/интерферон-индуцируемый  $\alpha$ -хемоаттрактант Т-клеток (I-TAC) и CXCL4L1, аналог CXCL4 [28—33]. В основном все эти антиангиогенные хемокины связываются рецепторами с CXCR3a и CXCR3b на эндотелиальных клетках, которые представляют собой сплайсинг варианты одного и того же гена [34]. У мышей, у которых отсутствует CXCR3, отмечается избыточное формирование сосудов при заживлении ран, что указывает на важную функцию этих хемокинов в регуляции сосудистого гомеостаза.

Такие хемокины, как CXCL4, CXCL9, CXCL10 и CXCL11, напрямую ингибируют индуцированный