

ИДЕНТИФИКАЦИЯ VEGF-R1 В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Е.Г. Тырсина, С.И. Никулицкий, А.Н. Иншаков, О.О. Рябая
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Цель исследования: Выявить и установить локализацию VEGF-R1 в опухолевых клетках человека различного гистогенеза.

Материалы и методы: В работе использованы линии опухолевых клеток человека: A431, A549, Sn12c. Оценку экспрессии гена VEGF-R1 (Flt1) проводили методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Наличие белка регистрировали при помощи иммуноцитохимического окрашивания (ИЦХ) и реакции непрямой иммунофлуоресценции (ИИФ). Для выяснения вопроса о присутствии рецептора в ядре нами разработан метод экстракции интактных клеточных ядер, пригодных для их последующего ИИФ-анализа на проточном цитофлуориметре.

Результаты и обсуждение: Во всех трех клеточных линиях выявлена базальная экспрессия гена Flt1, а также сам белок VEGF-R1. Вопреки общепринятому мнению о мембранной локализации тирозинкиназных рецепторов ИИФ-анализ показал высокое внутриклеточное содержание VEGF-R1 ($36,63 \pm 7,56\%$) при практически полном его отсутствии на поверхности клетки ($0,48 \pm 0,37\%$). Благодаря разработанной нами методике также была установлена ядерная локализация VEGF-R1, причем значительная часть рецептора детектировалась непосредственно внутри ядра ($17,9 \pm 1,04\%$). По нашему мнению, внутриядерный VEGF-R1 может реализовывать свое антиапоптотическое действие путем стабилизации ядерной ламины опухолевой клетки.

Выводы: По результатам работы выявлено, что опухолевые клетки человека различного гистогенеза экспрессируют VEGF-R1. Установлена преимущественно внутриклеточная локализация рецептора, при этом значительное его содержание зарегистрировано внутри ядра.

Ключевые слова: VEGF, VEGF-R1, тирозинкиназный рецептор, опухолевые клетки, интактные ядра, реакция иммунофлуоресценции.

IDENTIFICATION OF VEGF-R1 IN HUMAN TUMOR CELLS

E.G. Tyrsina, S.I. Nikulitskiy, A.N. Inshakov, O.O. Ryabaya

Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center»
of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

Objective. To detect and identify the source of VEGF-R1 localization in human tumor cells of different histogenesis.

Materials and Methods. A431, A549, Sn12c tumor cell lines were used in this work. VEGF-R1 (Flt1) gene expression was assessed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The presence of protein was detected using immunocytochemical staining (ICC) and indirect immunofluorescence test (IIFT). To clarify the question regarding the presence of receptor in nucleus we developed a method of isolation of intact cell nuclei suitable for their further indirect immunofluorescence test (IIFT) using flow cytofluorometry.

Results and Discussion. Basal expression of gene Flt1 just as VEGF-R1 protein were detected in all the three cell lines. Despite common belief about a membrane localization of tyrosine kinase receptors, immunofluorescence test indicates high intracellular content of VEGF-R1 ($36,63 \pm 7,56\%$) with its practically total absence on the cell surface ($0,48 \pm 0,37\%$). As a result of technology developed by us nuclear localization of VEGF-R1 was determined, and a considerable part of the receptor was detected directly inside the nucleus ($17,9 \pm 1,04\%$). In our view, intranuclear VEGF-R1 can carry out its anti-apoptotic action by stabilizing the nuclear lamina of a tumor cell.

Conclusions. On the basis of our work it was established that human tumor cells of different histogenesis express VEGF-R1. Predominantly intracellular localization of a receptor was identified, with its considerable part being detected inside the nucleus.

Key words: VEGF, VEGF-R1, tyrosine kinase receptor, tumor cells, intact nuclei, immunofluorescence reaction.

Введение. Регуляция ангиогенеза осуществляется целым семейством сигнальных белков. Среди них ведущую роль играет фактор роста эндотелия сосудов типа А (VEGF-A). В период эмбриогенеза VEGF-A стимулирует пролиферацию, миграцию и выживание эндотелиоцитов, что приводит к образованию кровеносной сети. Уже сформированные сосуды не нуждаются в VEGF-A, поэтому во взрослом организме его вклад в обеспечение нормальной жизнедеятельности не имеет критического значения. В противоположность этому развитие опухоли невозможно без собственного кровоснабжения [6]. Именно поэтому трансформированные клетки вырабатывают VEGF-A. Помимо стимуляции ангиогенеза данный белок способствует выживанию неопластических клеток путем подавления апоптоза, увеличивает вероятность метастазирования, а также угнетает иммунитет хозяина. В связи с этим выбор VEGF-A в качестве мишени антиангиогенной терапии опухолей кажется совершенно оправданным. Действительно, таргетный блокатор VEGF-A — Бевацизумаб — показал свою эффективность. Однако у него выявлены и такие существенные недостатки, как развитие резистентности, исходная нечувствительность к действию препарата, а также целый спектр побочных эффектов. Вероятно, эти нежелательные реакции обусловлены тонкой многоступенчатой регуляцией сложной системы VEGF/VEGF-рецепторы, где блокада одного звена не способна полностью подавить весь процесс. В частности, Бевацизумаб, элиминируя VEGF-A, не влияет на активность других представителей семейства — PlGF и VEGF-B, что позволяет опухоли успешно формировать сосудистую сеть за счет альтернативных путей [5]. Более того, VEGF-B, связываясь со своим специфическим рецептором 1 типа (VEGF-R1), индуцирует экспрессию целого ряда антиапоптотических генов, способствуя выживанию опухолевой клетки [10, 14]. Интересно, что в течение длительного времени VEGF-R1 вообще считался антиангиогенным рецептором: предполагали, что его экспрессия может даже тормозить развитие неоплазмы. Этот пример показывает, насколько важен комплексный подход к изучению системы VEGF/VEGF-рецепторы.

Несмотря на то что VEGF-R1 был открыт первым среди всех VEGF-рецепторов, он до сих

пор изучен слабо. Точно не установлены ни его тканеспецифичность, ни клеточная локализация, ни функциональное значение. Причиной этому, по-видимому, является тот факт, что основные ангиогенные эффекты VEGF традиционно относили к VEGF-R2 из-за его высокой тирозинкиназной активности. Каталитический потенциал VEGF-R1 значительно ниже, поэтому его вклад в ангиогенез предполагался минимальным. Это предположение подкреплялось сведениями о существовании, помимо мембранно-связанной (mVEGF-R1), еще и растворимой формы sVEGF-R1, образующейся в результате альтернативного сплайсинга мРНК VEGF-R1. Растворимая изоформа состоит только из лиганд-связывающей области и, как следствие, снижает доступность VEGF для мембранных рецепторов. Кроме того, sVEGF-R1 ингибирует и сами полноразмерные VEGF-R1 и -R2, поскольку формирует с ними неактивные химерные комплексы. В связи с этим рецептору 1 типа долгое время приписывали даже антиангиогенные свойства, чем и объясняется незначительный интерес к нему в онкобиологии.

Внимание к VEGF-R1 значительно возросло после того, как экспрессию данного рецептора обнаружили во многих неопластических клетках. Было показано, что активация рецептора 1 типа приводила к повышению выживаемости и усилению злокачественности опухолевых клеток: возрастала их способность к миграции, независимо от субстрата роста, а также инвазивный и метастатический потенциал [4, 13]. Все это прямо указывало на значимость VEGF-R1 для опухоли. Например, четко был доказан антиапоптотический эффект рецептора [9]. В клетках карциномы молочной железы человека при помощи РНК-интерференции полностью подавляли экспрессию одного из генов — VEGF-R1 или VEGF-R2. В то время как отсутствие VEGF-R2 никак не сказывалось на выживаемости, нокаун гена VEGF-R1 приводил к возрастанию апоптотической гибели клеток на 38%. Важно отметить, что блокада самого рецептора антителами не отменяла апоптоз. Результаты этой работы поставили под сомнение общепринятое мнение о мембранной локализации VEGF-R1. Стало понятно, что основной вклад в выживаемость изучаемых клеток вносил рецептор, расположенный внутри клетки, а не на ее поверхности,

как предполагали ранее. К сожалению, на сегодняшний день подобных целенаправленных исследований о локализации и механизмах действия рецептора 1 типа крайне мало, а имеющиеся результаты часто противоречат друг другу. Однако, несмотря на довольно скудную информацию о VEGF-R1, уже сейчас его вклад в канцерогенез не вызывает сомнений.

Учитывая наличие VEGF-R1 в большинстве опухолевых клеток и его возможную роль в прогрессии неоплазмы, рецептор 1 типа можно рассматривать как потенциальную мишень противоопухолевой терапии. Однако таргетное воздействие на него возможно только после выяснения точного местоположения рецептора. В связи с вышеизложенным целью работы явилось выяснение вопроса о локализации VEGF-R1 в злокачественных клетках.

Материалы и методы

Клеточные культуры

В работе использованы линии опухолевых клеток человека различного гистогенеза: A431 (эпидермоидная карцинома наружных женских половых органов), A549 (немелкоклеточный рак легкого), Sn12c (карцинома почки). Клетки выращивали в среде ДМЕМ (Gibco, Великобритания) с глутамином, содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки и антибиотик гентамицин (40 мкг/мл), в пластиковой культуральной посуде при температуре 37°C при подаче влажного воздуха с 5% CO₂. Клетки рассеивали в концентрации из расчета 1,5*10⁵/мл каждые 3 суток. Для снятия клеток с подложки использовали 0,25% раствор Трипсин-ЭДТА.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Экстракцию общей клеточной РНК осуществляли с использованием реагента TRIzol (Invitrogen, США). Реакционная смесь для наработки продуктов ПЦР содержала 1 мкл раствора кДНК; 20 пкмоль каждого из праймеров; 2,5 мМ смеси dNTP (MBI Fermentas, Литва); 2,5 мкл 10-кратного буфера с (NH₄)₂SO₄ (MBI Fermentas, Литва); 25 мМ MgCl₂; 1 ед. Taq-ДНК-полимеразы (MBI Fermentas, Литва); H₂O до конечного объема 25 мкл; минеральное масло 20 мкл. Для определения экспрессии Flt1 (VEGF-R1) были использованы следующие

нуклеотидные последовательности специфических праймеров:

FLT1-Forward

5'-CAGCTCCAAATATCTAGCTGTACC-3'

FLT1-Reverse

5'-GAGGACAAGAGTATGGCCTCTAAG-3'

Реакцию амплификации проводили на амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология, Россия) по следующей схеме: денатурация — 94° С, 10 с; отжиг праймеров — 60° С, 10 с; синтез — 72° С, 20 с. Количество циклов ПЦР равнялось 33.

В качестве внутреннего контроля для оценки количества взятой в реакцию РНК определяли экспрессию гена GAPDH. Продукты реакции ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2-процентном агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Размеры фрагментов оценивали в соответствии с расположением полос маркерной ДНК. Гель фотографировали при ультрафиолетовом возбуждении с помощью цифровой камеры Samsung CCTV LENZ (Корея).

Иммуноцитохимия (ИЦХ)

Иммуноцитохимическое окрашивание проводили на фиксированных метанолом клетках A431, A549, Sn12c. Для пермеабиллизации мембраны использовали 0,5% PBST (раствор 0,5% Тритона-X100 в PBS). В качестве первичных использовали кроличьи антитела #ab2350 (Abcam, Великобритания) в концентрации 50 мкг/мл по 50 мкл на пробу. Время инкубации составляло 30 мин. Вторичными антителами служили козы антикроличьи FITC-конъюгированные антитела #A11034:FITC (Invitrogen, США) в концентрации 10 мкг/мл по 30 мкл на пробу. Отрицательным контролем служили клетки, окрашенные одними вторичными антителами. Анализ полученных изображений осуществляли на люминесцентном микроскопе Nikon.

Реакция непрямой иммунофлуоресценции с клетками (ИРИФ с клетками)

Собранные с культуральных флаконов клетки трижды отмывали в PBS, подсчитывали и доводили до конечной концентрации из расчета 1*10⁶ на пробу. Часть клеток оставляли интактными, а другую подвергали

пермеабиллизации 90-процентным холодным метанолом с последующей отмывкой в PBS. К опытным пробам добавляли по 40 мкл мышинных первичных антител #MAB321 (R&D Systems, США) и инкубировали в течение 30 мин. После отмывки в PBS с 2-процентной сывороткой добавляли вторичные козы антимышинные антитела IgG:FITC #STAR70 (AbD Serotec, Великобритания) в концентрации 10 мкг/мл по 20 мкл на пробу и инкубировали 30 мин при 4° С. Отрицательным контролем служили пробы, окрашенные только вторичными антителами. Далее клетки дважды отмывали в PBS с 2-процентной сывороткой и ресуспендировали в 300 мкл 1-процентного раствора формалина в PBS. Экспрессию антигенов оценивали на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с возбуждением флуоресценции аргоновым лазером (488 нм). Анализируемый гейт устанавливали на основании комбинации светорассеяния и размера клеток с использованием программного обеспечения BD FACSDiva.

Экстракция интактных клеточных ядер

Клетки из расчета 1×10^7 на одну пробирку-эппендорф отмывали в среде при 1000 об/мин в течение 5 мин. К осадку добавляли 1,0 мл холодного PBS и центрифугировали 2 мин при 2000 об/мин. Далее каждую пробу ресуспендировали в 100 мкл буфера А [гипоосмолярный раствор, содержащий HEPES 10 mM (pH 7.9), $MgCl_2$ 5 mM, EDTA 0,1 mM, 1% Тритон-X100, таблетированный антипротеазный «коктейль» (Complete, Mini; Швейцария) и дитиотреитол]. Осадок мягко пикетировали и оставляли в буфере на 30 мин при 4° С. Все дальнейшие манипуляции проводили на льду. Чтобы разрушить набухшие клетки, полученную суспензию 10 раз пропускали через 1 мл шприц с иглой 26G, после чего отделяли цитозольную фракцию путем 2-минутного центрифугирования при 7000 об/мин при 4° С. Полученную ядерную фракцию 3 раза отмывали от остатков цитоплазмы в 800 мкл буфера А в течение 2 мин при 7000 об/мин на холоде. Для стабилизации ядер осадок ресуспендировали в 1,0 мл PBS с 5 mM $MgCl_2$ и оставляли в полученном растворе минимум на 18 часов при 4° С.

Цитологический анализ ядер

Жизнеспособность полученных ядер оценивали путем добавления трипанового синего в разбавленную в 5 раз суспензию с последующим микроскопическим исследованием свежих мазков. На препарате анализировали не менее 5 полей зрения, подсчитывая по 100 ядер в каждом.

Чистоту ядерной фракции контролировали с помощью окрашивания суспензии азур-эозином по Романовскому и гематоксилином по Майеру. Для этого мазки фиксировали 5 мин в 90-процентном метаноле, высушивали и окрашивали. Анализ препаратов осуществляли под световым микроскопом Nikon.

Реакция непрямой иммуофлуоресценции с ядрами (ИРИФ с ядрами)

Экспериментальным путем было подобрано оптимальное количество ядер на пробу для постановки ИРИФ. В каждую из пробирок для измерений добавляли по 400–500 мкл стабилизированной ядерной суспензии, что соответствовало $4\text{--}5 \times 10^6$ ядер. Одну часть суспензии сразу окрашивали соответствующими антителами, а другую подвергали пермеабиллизации, а затем метили. Для пермеабиллизации ядер использовали 90-процентный холодный метанол по 1,0 мл на пробу с последующей инкубацией в течение 10 мин.

Мечение ядер проводили с использованием в качестве первичных мышинными анти-VEGF-R1 антителами #MAB321 (R&D Systems, США) в концентрации 50 мкг/мл по 50 мкл на пробу. Время инкубации составляло 30 мин. Вторичными антителами служили козы антимышинные поликлональные IgG:FITC #STAR70 (AbD Serotec, Великобритания) в концентрации 10 мкг/мл по 30 мкл на пробу, инкубация длилась 30 мин при +4° С. Отрицательным контролем служили ядра, окрашенные только вторичными антителами.

Чтобы удостовериться в отсутствии остатков цитоплазмы в ядерном экстракте, интактные ядра метили первичными кроличьими антителами к бета-актину #4970L (Cell Signaling Technology, США) в разведении 1:200 по 50 мкл на пробу. Вторичными служили козы антикроличьи антитела IgG:Alexa Fluor 488 #A-11008 (Invitrogen, США) 1:1000 по 30 мкл.

Анализ ядер осуществляли на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva.

Область гейтирования определяли на логарифмическом графике «DotPlot» FSC/SSC. Для выбора гейта интактные стабилизированные ядра окрашивали раствором пропидий йодида (Becton Dickinson, США). Ядра в количестве $4-5 \cdot 10^6$ инкубировали 30 мин в 500 мкл раствора пропидий йодида в концентрации 50 мкг/мл при 4°C .

Статистическая обработка результатов

Все результаты исследований подвергали статистической обработке по *t*-тесту Стьюдента. Достоверными различиями считали значения при $p < 0,05$.

Результаты

Экспрессия гена *Flt1* (*VEGF-R1*)

в опухолевых клетках человека

Методом ОТ-ПЦР во всех исследованных клеточных линиях (A431, A549, Sn12c) была обнаружена базальная экспрессия гена *Flt1* (кодирующего *VEGF-R1*) (данные не приведены). Следует отметить, что используемые праймеры не позволяли дифференцировать различные изоформы *VEGF-R1*. Таким образом, результаты отражали тотальное содержание мРНК рецептора 1 типа в клетках.

Регистрация белка *VEGF-R1*

Иммуноцитохимическое исследование (ИЦХ)

В клеточных линиях A431, A549 и Sn12c определяли белок *VEGF-R1* с помощью иммуноцитохимического окрашивания. Результаты эксперимента подтвердили данные ОТ-ПЦР: все 3 исследуемые линии содержали изучаемый протеин. Анализ препаратов показал, что *VEGF-R1* преимущественно локализован в цитоплазме. В клетках A431 белок определялся наиболее отчетливо, в связи с чем указанная линия была выбрана для дальнейших исследований (рис. 1).

Иммунофлуоресцентный анализ опухолевых клеток (ИРИФ с клетками)

Результаты полуколичественного ИЦХ были подтверждены и дополнены более объективными данными ИРИФ с использованием проточного цитометра. В отличие от ИЦХ этот

метод дает возможность четко разграничить поверхностную и внутриклеточную локализации белка *VEGF-R1*. При анализе интактных клеток сигнал детектируется только от рецептора, расположенного на цитоплазматической мембране, а после ее пермеабиллизации антителам становится доступен и *VEGF-R1*, находящийся внутри клетки. Результаты 4-х независимых экспериментов с интактными клетками A431 засвидетельствовали практически полное отсутствие рецептора на цитоплазматической мембране ($0,48 \pm 0,37\%$) (рис. 2а). Эти данные расходятся с общепринятым мнением о поверхностной локализации тирозинкиназных рецепторов. Для проверки предположения о внутриклеточной локализации *VEGF-R1* следующая серия экспериментов проводилась с теми же клетками, но после пермеабиллизации метанолом. В этом случае уровень сигнала от рецептора оказался несоизмеримо выше, составив $36,63 \pm 7,56\%$ (рис. 2б). Неспецифическое связывание в контрольных пробах не превышало 0,5%.

Микроскопическое исследование клеточных ядер

В опытах с пермеабиллизованными клетками полученные значения отражали суммарное содержание рецептора внутри клетки, но не позволяли дифференцировать «цитоплазматический» *VEGF-R1* от «ядерного». Между тем связь любого белка с ядром позволяет судить

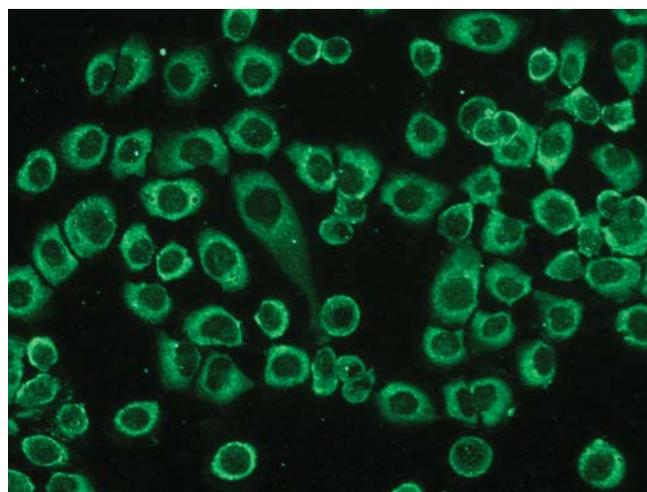


Рис. 1. Экспрессия *VEGF-R1* в цитоплазме клеток линии A431 (эпидермоидной карциномы наружных женских половых органов). Флуоресценция при воздействии лазера с $\lambda = 488 \text{ нм}$. Увеличение $\times 200$

о его функциональной активности. Поэтому для выяснения вопроса о возможной ядерной локализации рецептора нами была разработана щадящая методика выделения интактных, функционально активных ядер, пригодных для анализа на проточном цитофлуориметре.

Для постановки РИФ на ядрах необходимо было убедиться в качестве ядерного экстракта. Окраска мазков стабилизированной суспензии трипановым синим выявила, что практически все ядра в ней оказались жизнеспособными (~98%), при этом количество поврежденных или слипшихся ядер было незначительным.

Кроме того, фиксированные мазки окрашивали гематоксилином по Майеру и азур-эозином (рис. 3). На представленном снимке хорошо видно, что ядерная мембрана не нарушена, а в кариоплазме различимы ядрышки. Остатки цитоплазмы не выявляются, о чем свидетельствует отсутствие розовой окраски эозином. Таким образом, мы убедились, что полученная ядерная фракция состоит из одиночных неповрежденных клеточных ядер, что является необходимым условием для постановки РИФ.

Иммунофлуоресцентное исследование клеточных ядер (нРИФ с ядрами)

Иммунофлуоресцентный анализ ядер проводился по аналогии с таковым на клетках: изучали локализацию VEGF-R1 на поверхности (интактные ядра) и внутри ядра (после пермеабилзации). Содержание рецептора 1 типа на наружной

ядерной мембране составляло $4,8 \pm 0,26\%$ (рис. 4а). Чтобы убедиться в отсутствии возможной примеси цитоплазмы на ядерной оболочке, контрольные пробы окрашивали антителами к бета-актину. Было показано, что во всех экспериментах экспрессия данного белка не превышала 1%, что еще раз подтвердило чистоту ядерной фракции. В экспериментах с пермеабилзованными ядрами уровень сигнала оказался в 3,7 раза выше по сравнению с интактными ($17,9 \pm 1,04\%$) (рис. 4б). Неспецифическое связывание в контрольных пробах не превышало 0,5%.

Следовательно, значительная часть рецептора 1 типа присутствует внутри ядра: либо во взаимосвязи с ядерной ламиной, либо непосредственно в кариоплазме. В любом случае сам факт ядерной локализации VEGF-R1 свидетельствует о его функциональной активности в опухолевой клетке.

Обсуждение результатов

Поскольку положение рецептора может кардинальным образом влиять на проводимость сигнала, активацию факторов транскрипции и множество других внутриклеточных событий, данные о локализации VEGF-R1 являются необходимым этапом в установлении его роли в канцерогенезе.

В ходе работы нами была выявлена как базальная экспрессия гена VEGF-R1 (Flt1), так и сам белок в клетках трех опухолевых линий человека — A431, A549, Sn12c. Эти данные

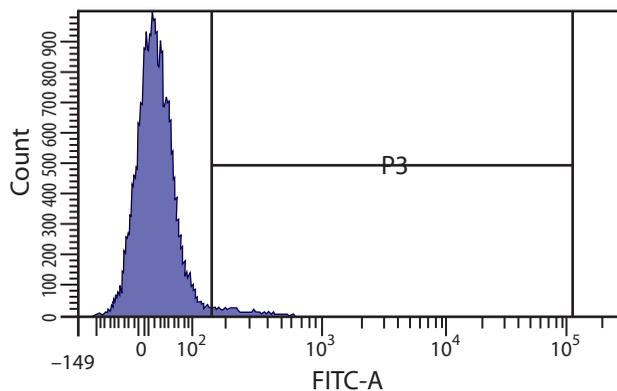


Рис. 2а. Реакция иммунофлуоресценции на интактных клетках линии A431. Чрезвычайно низкая экспрессия VEGF-R1 на цитоплазматической мембране ($0,48 \pm 0,37\%$). Гистограмма интенсивности флуоресценции

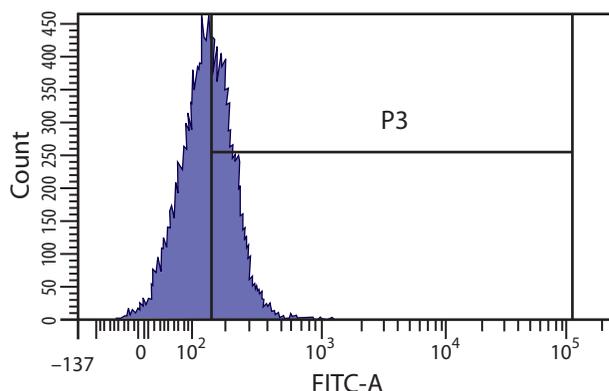


Рис. 2б. Реакция иммунофлуоресценции на пермеабилзованных метанолом клетках A431. Выявлена преимущественно внутриклеточная экспрессия VEGF-R1 ($36,63 \pm 7,56\%$). Гистограмма интенсивности флуоресценции

дополняют перечень злокачественных новообразований, в клетках которых ранее был обнаружен VEGF-R1 (карцинома молочной и поджелудочной железы, рак толстой кишки, липосаркома, глиобластома) [4, 9, 11, 13]. Многочисленные сообщения о наличии рецептора 1 типа в опухолевых клетках косвенно свидетельствуют о его значимости для неоплазмы.

Вопреки общепринятому мнению о поверхностной локализации тирозинкиназных рецепторов результаты нРИФ с клетками засвидетельствовали преимущественно внутриклеточное содержание VEGF-R1 и практически полное его отсутствие на цитоплазматической мембране (36,63% против 0,48%).

Для детального изучения распределения рецептора 1 типа внутри клетки мы разработали метод иммунофлуоресцентного анализа чистой фракции интактных клеточных ядер на проточном цитометре. В результате установлена ассоциация VEGF-R1 с ядром опухолевой клетки. Причем экспрессия рецептора внутри ядра оказалась почти в 4 раза выше, чем на ядерной поверхности.

Интересно, что долгое время считалось, будто VEGF-R1 экспрессируется исключительно эндотелиоцитами, а его основная функция связана с антиангиогенным действием за счет снижения доступности лиганда (т.н. decoy-рецептор) для ключевого стимулятора ангиогенеза VEGF-R2. С этой точки зрения рецептор 1 типа должен был бы даже подавлять опухолевый рост, нарушая формирование сосудистой сети неоплазмы.

Однако в дальнейшем, по мере получения новых сведений, гипотеза подверглась пересмотру. Во-первых, анализ клинических данных, охватывающий почти 2000 больных, показал, что VEGF-R1 выявлялся не только в эндотелиоцитах, но и в самих клетках карциномы молочной железы. И только во втором случае степень экспрессии рецептора коррелировала с высоким риском метастазирования и рецидивирования [2, 3]. В отношении VEGF-R2 такая зависимость отмечена не была. Полученные клинические данные согласуются с экспериментами *in vivo* на трансгенных мышах, несущих делецию по тирозинкиназному домену -R1 (VEGF-R1 TK-/-). Оказалось, что скорость роста опухолей у таких животных замедлялась [7]. Кроме того,

метастазирование в легкие перевиваемой карциномы Льюиса у этих мышей было значительно ниже по сравнению с животными дикого типа VEGF-R1 TK+/+ [8].

Во-вторых, *in vitro* на клетках карциномы поджелудочной железы и толстой кишки была обнаружена экспрессия рецептора 1 типа, а также подтвержден его вклад в прогрессию опухоли. Авторами было показано, что при стимуляции VEGF-R1 (но не VEGF-R2) такие свойства, как миграция, инвазия и независимый от субстрата рост, усиливались [4].

В-третьих, появляется все больше свидетельств антиапоптотического эффекта VEGF-R1. Предполагают, что в реализации данной функции, наряду VEGF-A, принимает участие и специфический лиганд рецептора 1 типа — VEGF-B [10, 14]. Все вышеперечисленное заставляет пересмотреть устоявшееся мнение о значении VEGF-R1 лишь как о decoy-рецепторе: вероятно, его эффекты не ограничиваются влиянием на опухолевый ангиогенез. Похоже, ключевая роль VEGF-R1 в канцерогенезе заключается в поддержании стабильности самой неопластической клетки и усилении ее злокачественного фенотипа.

Вместе с тем точные механизмы действия VEGF-R1 в опухолевой клетке остаются предметом дискуссий. Одни авторы по-прежнему

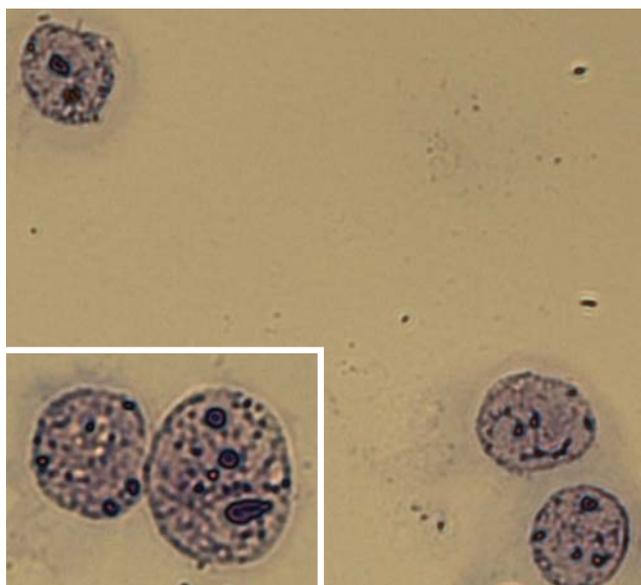


Рис. 3. Микрофотография интактных ядер, экстрагированных из клеток A431. Окраска азур-эозином по Романовскому. Увеличение x400

считают, что в опухолевый рост и прогрессию вовлечен рецептор, расположенный на цитоплазматической мембране. Так, на клетках множественной миеломы и колоректального рака показано, что блокада VEGF-R1 антителами приводила к уменьшению злокачественности клеток. В связи с этим делается вывод, что активация рецептора лигандом осуществляется по аутокринному либо паракринному механизму [4, 12].

Другие исследователи предполагают существование механизма стимуляции VEGF-R1 непосредственно внутри клетки (т.н. интракрина «петля») [1, 9]. Так, Lee et al. (2007) на линиях карциномы молочной железы методом ИЦХ с применением конфокальной микроскопии обнаружили ко-локализацию рецептора 1 типа с ядерной ламиной, что, по их мнению, обеспечивает защиту клетки от апоптотической гибели. В этом случае возможны два механизма реализации антиапоптотического действия VEGF-R1. Первый предполагает физическую стабилизацию ядерных белков-ламин за счет их прямого взаимодействия с комплексом лиганд-рецептор. Другим интракринальным путем может явиться активация сигнальных путей, препятствующих апоптозу. Причем такая активация может происходить либо в результате фосфорилирования белков киназным доменом VEGF-R1, либо, учитывая низкий тирозинкиназный потенциал рецептора, за счет различных белок-белковых взаимодействий [1].

Полученные нами данные о внутриклеточной локализации рецептора подтверждают точку зрения об аутокринном механизме стимуляции

VEGF-R1, несмотря на то что в качестве основного нами был применен другой методический подход (РИФ с клетками и ядрами). По нашему мнению, расхождения в выводах вышеприведенных работ могут быть обусловлены как различными объектами исследования (клеточными линиями), так и различающимися методическими приемами. Первая группа авторов даже не принимала во внимание самой возможности присутствия VEGF-R1 внутри клетки и поэтому не проводила экспериментов, направленных на идентификацию и установление роли внутриклеточного пула рецептора. Возможно, при адекватной методологии исследований результаты работ не противоречили бы друг другу. Приведенный пример показывает, что для выяснения точных механизмов действия VEGF-R1 необходимы дальнейшие комплексные исследования.

В последнее время появляется все больше и больше сообщений о важной роли рецептора 1 типа в развитии и прогрессировании злокачественных новообразований. Учитывая это, VEGF-R1 можно рассматривать как еще одну перспективную мишень при противоопухолевой терапии. А если допустить, что показанная нами внутриклеточная локализация рецептора 1 типа характерна для всех неопластических клеток, то необходимо подбирать способы ингибирования системы VEGF/VEGF-R1 строго внутри клетки, например, с использованием генно-инженерных технологий, в то время как применение моноклональных антител не принесет желаемого клинического эффекта.

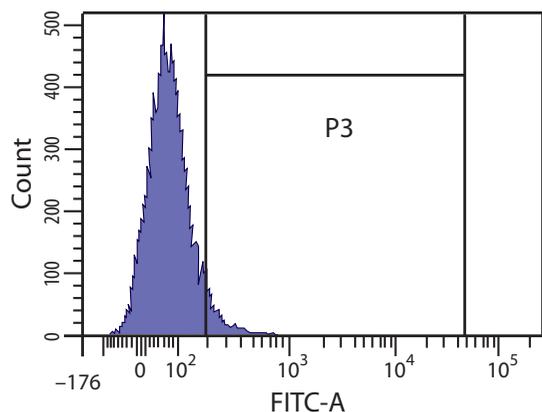


Рис. 4а. Реакция иммунофлуоресценции на интактных клеточных ядрах A431. Экспрессия VEGF-R1 на наружной ядерной мембране ($4,8 \pm 0,26\%$). Гистограмма интенсивности флуоресценции

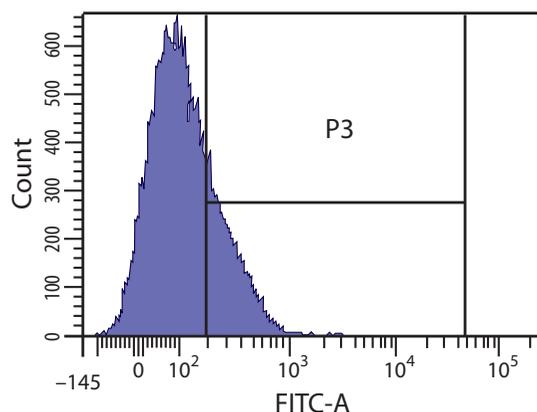


Рис. 4б. Реакция иммунофлуоресценции на пермеабелизованных метанолом клеточных ядрах A431. Высокая внутриядерная экспрессия VEGF-R1 ($17,9 \pm 1,04\%$). Гистограмма интенсивности флуоресценции

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bhattacharya R., Ye X.C., Wang R. et al.* Intracrine VEGF Signaling Mediates the Activity of Pro-survival Pathways in Human Colorectal Cancer Cells // *Cancer Res.* — 2016, March 17. — doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1605.
2. *Dales J., Garcia S., Bonnier P. et al.* Prognostic significance of VEGF receptors, VEGF-R1 (Flt-1) and VEGF-R2 (KDR/Flk-1) in breast carcinoma // *Ann. Pathol.* — 2003. — Vol. 23. — P. 297–305.
3. *Dales J., Garcia S., Carpentier S. et al.* Prediction of metastasis risk (11 year follow-up) using VEGF-R1, VEGF-R2, Tie-2/Tek and CD105 expression in breast cancer (n=905) // *Br. J. Cancer* — 2004. — Vol. 90. — P. 1216–1221.
4. *Fan F., Wey J.S., McCarty M.F. et al.* Expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells // *Oncogen.* — 2005. — Vol. 24. — P. 2647–2653.
5. *Fischer C., Mazzone M., Jonckx B. et al.* FLT1 and its ligands VEGFB and PIGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? // *Reviews Cancer.* — 2008. — Vol. 8. — P. 942–956.
6. *Folkman J.* Tumor angiogenesis: therapeutic implications // *N. Engl. Med.* — 1971. — V. 285. — P. 1182–1186.
7. *Hiratsuka S., Minova O., Kuno J. et al.* Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1998. — V. 95. — P. 9349–9354.
8. *Hiratsuka S., Nakamura K., Iwai S. et al.* MMP-9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung specific metastasis // *Cancer Cell.* — 2002. — Vol. 2. — P. 289–300.
9. *Lee T.-H., Seng S., Sekine M. et al.* Vascular Endothelial Growth Factor Mediates Intracrine Survival in Human Breast Carcinoma Cells through Internally Expressed VEGFR1/FLT1 // *PLOS Medicine.* — 2007. — Vol. 4(6). — P. 1001–1016.
10. *Li Y., Zhang F., Nagai N. et al.* VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1-mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats // *J. Clin. Invest.* — 2008. — Vol. 118(3). — P. 913–923.
11. *Szabo E., Schneider H., Seystahl K. et al.* Autocrine VEGFR1 and VEGFR2 signaling promotes survival in human glioblastoma models in vitro and in vivo // *Neuro Oncol.* — 2016, March 23. — doi:10.1093/neuonc/now043.
12. *Vincent L., Jin D.K., Karajannis M.A. et al.* Fetal stromal-dependent paracrine and intracrine vascular endothelial growth factor- α /vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling promotes proliferation and motility of human primary myeloma cells // *Cancer Res.* — 2005. — Vol. 65. — P. 3185–3192.
13. *Wey J.S., Fan F., Gray M.J. et al.* Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines // *Cancer.* — 2005. — Vol. 104. — P. 427–438.
14. *Zhang F., Tang Z., Hou X. et al.* VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis // *PNAS.* — 2009. — Vol. 106(15). — P. 6152–6157.

АВТОРЫ

Тырсына Екатерина Григорьевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва. E-mail: tyrsina@yandex.ru

Tyrsina Ekaterina Grigor'evna, Sc.D., general researcher of Laboratory of Experimental Diagnostic and Tumors Biotherapy. Institute of Experimental Diagnostic and Tumors Therapy of FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow. E-mail: tyrsina@yandex.ru

Никулицкий Сергей Игоревич, аспирант лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва.

Nikulitskiy Sergey Igorevich, graduate student of Laboratory of Experimental Diagnostic and Tumors Biotherapy. Institute of Experimental Diagnostic and Tumors Therapy of FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow.

Ишяков Андрей Николаевич, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДиТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Inshakov Andrey Nikolaevich, M.D., researcher of Laboratory of Experimental Diagnostic and Tumors Biotherapy. Institute of Experimental Diagnostic and Tumors Therapy of FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow.

Рябая Оксана Олеговна, младший научный сотрудник лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза НИИ ЭДиТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва.

Ryabaya Oxana Olegovna, junior researcher of Laboratory of Biomarkers and Mechanisms of Tumor Angiogenesis. Institute of Experimental Diagnostic and Tumors Therapy of FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow.