



УДК 616.34-002-02+616.34:611.13/14

© 2010

Г. М. Толстанова, Л. І. Остапченко

## Активация VEGF/VEGFR-2-асоційованих шляхів трансдукції сигналу при експериментальному виразковому коліті

(Представлено членом-кореспондентом НАН України С. О. Костеріним)

*Встановлено збільшення експресії протеїну VEGF й VEGFR-2 у товстій кишці мишей із спонтанно виникаючим хронічним виразковим колітом на фоні дефіциту інтерлейкіну-10. Це підвищення було асоційоване: зі збільшенням загального рівня протеїну Src та його активацією; з підвищенням рівня фосфорилування Akt на фоні незмінного рівня експресії загального протеїну; зі зниженням ступеня фосфорилування Erk 1/2 за умов незмінної експресії загальних протеїнів Erk 1/2. Зроблено висновок про провідну роль VEGF/VEGFR-2-асоційованих шляхів трансдукції сигналу (Src, Akt), що опосередковують збільшення проникності кровоносних судин, при хронічному перебігу експериментального виразкового коліту.*

Фактор росту кровоносних судин (VEGF) належить до родини глікопротеїнів, яка у ссавців складається з п'яти членів: VEGF-A, -B, -C, -D та фактора росту плаценти. Форма А — найкраще вивчена, вона відіграє центральну роль у регуляції ангиогенезу (формування нових кровоносних судин) [1]. Численні дослідження *in vivo* й *in vitro*, в яких моделювали рівень експресії рецепторів VEGFR-1 й VEGFR-2, показали провідну роль VEGFR-2 в опосередкуванні дії VEGF на процеси фізіологічного та патологічного ангиогенезу [2, 3]. Активация рецепторів 2 типу VEGF призводить до його димеризації, аутофосфорилування по тирозинових залишках (Tyr 951, Tyr 1175, Tyr 1214) і запуску різних шляхів трансдукції сигналу, які опосередковують вплив фактора росту на проліферацію, міграцію, виживання ендотеліальних клітин та проникність кровоносних судин. VEGFR-2-опосередкована активация позаклітинних сигнально-регулювальних кіназ (MAPK/Erk 1/2) спричинює проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин [4]. Через активацию Src- й Akt-шляхів здійснюється вплив на проникність кровоносних судин [5, 6]. Крім того, Akt-шлях бере участь у VEGFR-2-опосередкованій дії на виживання та проліферацію ендотеліальних клітин [5, 7].

Виразковий коліт характеризується неспецифічним імунним запаленням і виразками стінки кишечника з частими рецидивами та хронічним перебігом хвороби. Підвищений рівень експресії VEGF й VEGF-рецепторів у патогенезі виразкового коліту був показаний клінічними та експериментальними дослідженнями [8, 9]. Більш того, блокада активності VEGF [8, 9] й VEGFR-2 [10] справляла лікувальну дію на експериментальних моделях виразкового коліту.

VEGF на відміну від інших проангіогенних факторів росту, поряд із стимуляцією проліферації та міграції ендотеліальних клітин, що сприяє формуванню грануляційної тканини та загоєнню виразок [11], є потужним стимулятором проникності кровоносних судин і, як наслідок, спричинює хронізацію запального процесу, збільшення інфільтрації лейкоцитів та затримку загоєння виразок [8]. Зважаючи на сказане вище, ми припустили, що за умов хронічного перебігу виразкового коліту переважають VEGFR-2-активовані шляхи трансдукції сигналу, які відповідають за VEGF-викликану проникність кровоносних судин. Для перевірки цього припущення нами досліджено рівень активації основних VEGFR-2-опосередкованих шляхів MAPK/Erk 1/2 та Akt, Src при спонтанно виникаючому хронічному виразковому коліті у мишей з відсутнім геном до антизапального цитокіну інтерлейкіну-10 (IL-10<sup>-/-</sup> миші).

Дефіцит антизапального цитокіну IL-10 викликає спонтанний розвиток виразкового коліту у мишей, який за клінічними та морфологічними ознаками відповідає основним критеріям розвитку даної патології. Ми використовували IL-10<sup>-/-</sup> мишей-самців (B6.129P2-Il10<sup>tm1Cgn</sup>/J) у віці 12 тижнів, виведених на основі лінії C57BL6 (The Jackson Laboratory, США). Контролем слугували інтактні миші лінії C57BL6 у віці 12 тижнів. Мишей умертвляли шляхом інгаляції з CO<sub>2</sub> та подальшою цервікальною дислокацією, видаляли товсту кишку від анального отвору до сліпої кишки та відразу занурювали в рідкий азот. Концентрацію загального білка визначали методом Бредфорда з використанням набору "Bio-Rad" для білкового аналізу (Bio-Rad, США), експресію білків — методом Вестерн блот з використанням первинних антитіл проти VEGF (1 : 500), VEGFR-2 (1 : 200), Erk 1 (1 : 500), Erk 2 (1 : 500), Src (1 : 500) (Santa-Cruz Biotech., США) та Akt (1 : 500) (Cell signaling, США). Для визначення ступеня активації VEGFR-2-асоційованих сигнальних шляхів було виміряно експресію фосфорильованого Erk (pErk<sup>Tyr204</sup>), Src (pSrc<sup>Tyr416</sup>) (1 : 500), (Santa-Cruz Biotech., США) та Akt білка (pAkt<sup>Ser473</sup>) (1 : 500) (Cell signaling, США). Візуалізацію Вестерн блот проводили ECL-реагентом (Amersham Biosciences, США). Результати не менше трьох різних експериментів піддавали аналізу за допомогою програми Phoretix1D. Статистичну обробку результатів проводили за *t* тестом Стьюдента. Дані представлені у вигляді  $M \pm \sigma$  і *n* — кількість тварин у групі. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю  $p \leq 0,05$ .

У першій частині наших досліджень було перевірено рівень експресії білка VEGF й VEGFR-2 у слизовій оболонці товстої кишки IL-10<sup>-/-</sup> мишей. Як видно з рис. 1, експресія VEGF протеїну значно збільшується у IL-10<sup>-/-</sup> мишей у віці 12 тижнів порівняно з показниками в інтактних мишей тієї самої вікової групи ( $p \leq 0,01$ ). Ген VEGF-A містить ділянку, чутливу до гіпоксії в положенні 5' та 3' UTR, тому зміни в оксигенації тканини викликає швидке та стабільне збільшення експресії VEGF [12]. Численими клінічними та експериментальними дослідженнями показано зниження оксигенації епітеліальних клітин товстої кишки в патогенезі запальних захворювань кишечника [13], що може бути причиною постійного синтезу VEGF та сприяти його патогенетичній дії. Так, у трансгенних мишей, які мали підвищену експресію VEGF у різних тканинах, новоутворені кровоносні су-

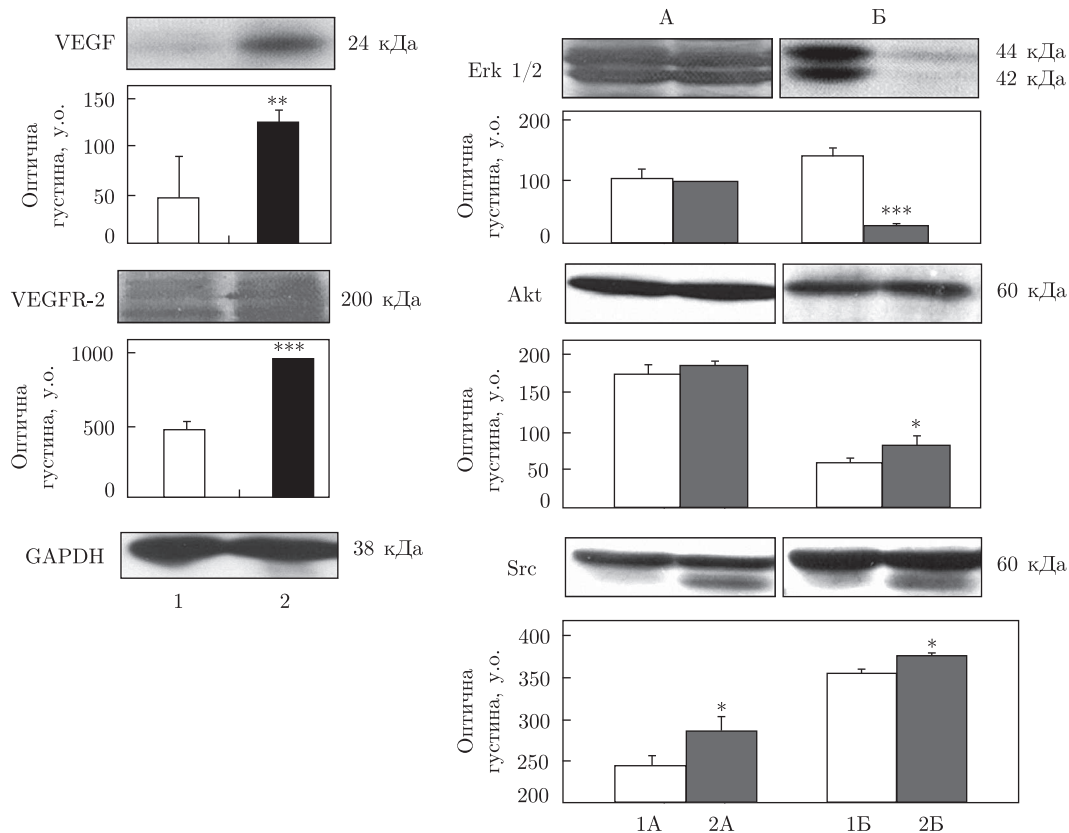


Рис. 1. Експресія VEGF, VEGFR-2 та ступінь активації VEGFR-2-асоційованих шляхів трансдукції сигналу в слизовій оболонці товстої кишки при спонтанно виникаючому виразковому коліті в ІЛ-10<sup>-/-</sup> мишей віком 12 тижнів (2, 2А, 2В) у порівнянні з інтактними мишами (контроль: 1, 1А, 1В).

Вестерн блотинг. А — рівень експресії загального протеїну; Б — рівень експресії фосфорильованої форми.  $n = 5$ .

Відносно відповідної контрольної групи: \* —  $p \leq 0,05$ ; \*\* —  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* —  $p \leq 0,001$

дини характеризувались підвищеною проникністю, порушенням структури та надзвичайно збільшеним просвітом судин [14]. Аналогічно до рівня експресії VEGF протеїну, експресія VEGFR-2 протеїну також вірогідно збільшувалась у слизовій оболонці товстої кишки ІЛ-10<sup>-/-</sup> мишей ( $p \leq 0,001$ ).

Оскільки ефекти VEGF на ендотеліальні клітини опосередковуються через різні VEGFR-2-активовані внутрішньосигнальні каскади, наступним етапом наших досліджень було визначення ступеня їх активації при хронічному виразковому коліті в ІЛ-10<sup>-/-</sup> мишей. В наших дослідженнях рівень експресії загальних протеїнів Erk 1 й Erk 2, активація яких призводить до проліферації, міграції ендотеліальних клітин [4], був однаковим в інтактних та ІЛ-10<sup>-/-</sup> мишей усіх вікових груп. Однак рівень фосфорилування цих протеїнів значно зменшувався в ІЛ-10<sup>-/-</sup> мишей в порівнянні з інтактними мишами відповідної вікової групи.

Рівень експресії загального протеїну Akt, активація якого опосередковує вплив VEGF на виживання ендотеліальних клітин та проникність кровоносних судин, був також однаковим в інтактних та ІЛ-10<sup>-/-</sup> мишей. Рівень фосфорилування цього протеїну в ІЛ-10<sup>-/-</sup> мишей був вищим у порівнянні з інтактними мишами.

У попередніх дослідженнях на моделі хімічно-викликаного коліту в щурів, було показано провідну роль Src-протеїнкіназ у регуляції проникності кровоносних судин слизової оболонки товстої кишки при даній патології [15]. Розвиток виразкового коліту в ІЛ-10<sup>-/-</sup> мишей асоціюється як зі збільшенням експресії загального протеїну Src-протеїнкіназ, так і з підвищенням рівня його фосфорилування.

Таким чином, нами вперше було проведено дослідження рівня активації VEGFR-2 — асоційованих внутрішньоклітинних сигнальних шляхів за умов розвитку спонтанно виникаючого виразкового коліту в ІЛ-10<sup>-/-</sup> мишей. Показано переважання активації Src-протеїнкіназ, які відіграють центральну роль у VEGF/VEGFR-2-опосередкованому збільшенні проникності кровоносних судин. Фосфорилування протеїну Akt, який також частково опосередковує дію VEGF на проникність кровоносних судин і значною мірою зумовлює їх виживання, було теж збільшене, але меншою мірою. Навпаки, рівень активації Erk 1/2 був знижений в ІЛ-10<sup>-/-</sup> мишей. Отже, можна зробити висновок про провідну роль VEGF/VEGFR-2-асоційованих шляхів трансдукції сигналу, що опосередковують збільшення проникності кровоносних судин, при хронічному перебігу експериментального виразкового коліту.

*Роботу виконано в рамках програм фонду Цивільних досліджень розвитку США, за договором М/203–2009.*

1. Carmeliet P., Ferreira V., Breier G. et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele // Nature. – 1996. – **380**, No 6573. – P. 435–439.
2. Rahimi N., Dayanir V., Lashkari K. Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor – 1 (VEGFR – 1) modulates mitogenic activity of VEGFR – 2 in endothelial cells // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**, No 22. – P. 16986–16992.
3. Landgren E., Schiller P., Cao Y. et al. Placenta growth factor stimulates MAP kinase and mitogenicity but not phospholipase C-gamma and migration of endothelial cells expressing Flt 1 // Oncogene. – 1998. – **16**, No 3. – P. 359–367.
4. Holmes K., Roberts O. L., Thomas A. M. et al. Vascular endothelial growth factor receptor – 2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition // Cell Signal. – 2007. – **19**, No 10. – P. 2003–2012.
5. Cantley L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway // Science. – 2002. – **296**, No 5573. – P. 1655–1657.
6. Gavard J., Gutkind J. S. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the -arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin // Nat. Cell. Biol. – 2006. – **8**, No 11. – P. 1223–1234.
7. Kobayashi I., Semba S., Matsuda Y. et al. Significance of Akt phosphorylation on tumor growth and vascular endothelial growth factor expression in human gastric carcinoma // Pathobiology. – 2006. – **73**, No 1. – P. 8–17.
8. Tolstanova G., Khomenko T., Deng X. et al. Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody reduces severity of experimental ulcerative colitis in rats: direct evidence for the pathogenic role of VEGF // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2009. – **328**, No 3. – P. 749–757.
9. Scaldaferrri F., Vetrano S., Sans M. et al. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis // Gastroenterology. – 2009. – **136**, No 2. – P. 585–595.
10. Im E., Rhee S. H., Park Y. S. et al. The corticotropin releasing hormone family of peptides regulates intestinal angiogenesis // Ibid. – 2010. – **138**, No 7. – P. 2457–2467.
11. Deng X., Szabo S., Khomenko T. et al. Gene therapy with adenoviral plasmids or naked DNA of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor accelerates healing of duodenal ulcer in rats // J. Pharm. Exp. Ther. – 2004. – **311**, No 3. – P. 982–988.
12. Liu Y., Cox S. R., Morita T. et al. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer // Circ. Res. – 1995. – **77**, No 3. – P. 638–643.
13. Taylor C. T., Colgan S. P. Hypoxia and gastrointestinal disease // J. Mol. Med. – 2007. – **85**, No 12. – P. 295–300.
14. Thurston G., Suri C., Smith K. et al. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiotensin – 1 // Science. – 1999. – **286**. – P. 2511–2514.

15. Tolstanova G. M., Khomenko T. A., Ostapchenko L. I. et al. The role of src kinases in the mechanisms of increased colonic vascular permeability during experimental ulcerative colitis // Ukr. Biochem. J. – 2010. – 82, No 1. – P. 46–51.

Київський національний університет  
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 01.04.2010

**G. M. Tolstanova, L. I. Ostapchenko**

**Activation of VEGF/VEGFR-2-associated signal transduction pathways during experimental ulcerative colitis**

*We demonstrate the increased protein expression of VEGF and VEGFR-2 in colonic tissue of IL-10 knockout mice (IL-10<sup>-/-</sup> mice) with spontaneously developed ulcerative colitis. It is associated with increased levels and the phosphorylation of Src kinase. We found no difference in levels of Akt, while levels of phosphorylation were higher in IL-10<sup>-/-</sup> vs. wild type mice. Levels of Erk1/2 expression were similar in wild type and IL-10<sup>-/-</sup> mice. But the levels of phosphorylation were significantly decreased in IL-10<sup>-/-</sup> vs. wild type mice. We concluded that VEGF/VEGFR-2-associated signal transduction pathways (Src, Akt) that mediate the increased vascular permeability play a central role in the perpetuation of experimental ulcerative colitis.*