

А.А. Корчагина¹, С.А. Шейн², О.И. Гурина², В.П. Чехонин^{1,2}

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Российская Федерация

² ГНЦ социальной и судебной психиатрии им. В.П. Сербского, Москва, Российская Федерация

Роль рецепторов VEGFR в неопластическом ангиогенезе и перспективы терапии опухолей мозга

Ввиду быстрой прогрессии, активного ангиогенеза, интенсивной инвазии и резистентности опухолей мозга подходы к традиционной терапии остаются малоэффективными. В связи с этим активно изучают новые стратегии избирательного ингибирования критических стадий опухолевой прогрессии. Важнейшим фактором развития и роста солидных опухолей является неопластический ангиогенез, ключевую роль в регуляции которого играет фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и его рецептор 2-го типа (VEGFR2). Именно поэтому VEGFR2 как основной рецептор трансдукции проангиогенного сигнала рассматривают в качестве молекулярной мишени для антиангиогенной терапии. Ингибиторы VEGF и VEGFR2 подавляют пролиферацию, миграцию и выживаемость эндотелиоцитов, что приводит к регрессии сосудистой сети, снижению плотности и проницаемости сосудов; таким образом, замедляется рост опухоли. В настоящее время ряд ингибиторов VEGFR2 (рамуцирумаб, цедираниб) проходит клинические испытания. Несмотря на многообещающие результаты экспериментальных исследований, эффективность антиангиогенных препаратов в клинической практике оказывается существенно ниже. Это связано прежде всего с адаптивной устойчивостью малигнизированных клеток, которая включает активацию альтернативных проангиогенных путей, рекрутирование предшественников эндотелиальных клеток из костного мозга и увеличение вклада инвазивного роста. Учитывая многообразие существующих проангиогенных сигнальных механизмов, для повышения эффективности противоопухолевой терапии специфическое подавление функций VEGFR2 необходимо дополнять другими антиангиогенными препаратами (анти-VEGF, -PIGF, -HIF1 α). Кроме того, мультитаргетная стратегия должна быть направлена на комбинированное подавление ангиогенеза, инвазии, метастазирования, пролиферации и выживаемости опухолевых клеток.

Ключевые слова: VEGF, VEGFR2, ангиогенез, ингибиторы ангиогенеза, опухоли мозга, направленная терапия.
(Вестник РАМН. 2013; 11: 104–114)

104

Введение

Несмотря на очевидный прогресс методов ранней диагностики опухолей мозга и расширение спектра средств борьбы с ними, смертность от опухолей центральной нервной системы превышает 3% от смертности вслед-

ствие злокачественных новообразований (по данным экспертов Всемирной организации здравоохранения). При этом важно отметить, что более 45% всех опухолей мозга составляют глиомы III–IV степени злокачественности. Наиболее малигнизирующей из них является мультиформная глиобластома, которая характеризуется быстрым

A.A. Korchagina¹, S.A. Shein², O.I. Gurina², V.P. Chekhonin^{1,2}

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

² Serbsky State Scientific Center for Social and Forensic Psychiatry, Moscow, Russian Federation

Vegfrs in Neoplastic Angiogenesis and Prospects for Therapy of Brain Tumors

Glioblastoma (GBM) is the most common type of primary brain cancer that characterized by poor prognosis due to the rapid progression, active angiogenesis, enhanced tumor cell invasion and the emergence of resistance toward conventional therapy. In this connection, nowadays, new approaches for selective inhibition of crucial steps in tumor progression are actively developing. The key feature of tumor growth and development is angiogenesis. VEGF and its receptor VEGFR2 play the pivotal role in regulation of tumor vessel formation. Therefore, VEGFR2, as the main receptor of VEGF's pro-angiogenic signal transducer, is a promising molecular target for anti-angiogenic therapy. There is evidence that inhibitors of VEGF and VEGFR2 reduce endothelial cell proliferation, migration and survival that lead to regression of vessel density and decrease vascular permeability, thereby slowing tumor growth. Currently, a number of VEGFR2 inhibitors are under clinical trials (ramucirumab, cediranib) and several were approved (sunitinib, sorafenib). Despite the promising results of preclinical studies, the efficacy of antiangiogenic drugs in the clinical practice is significantly lower, mainly, due to rapid adaptation of malignant cells that consists of alternative pro-angiogenic pathways activation, recruitment of endothelial progenitor cells from bone marrow and increasing of the invasive growth. Given the diversity of pro-angiogenic mechanisms, enhancement of the efficacy of tumor therapy could be achieved by specific inhibition of VEGFR2 functions that will be supplemented by other antiangiogenic drugs (anti-VEGF, -PIGF, -HIF1 α). In addition, multitargeting therapy should focus on the combined inhibition of angiogenesis, invasion, metastasis, proliferation and survival of tumor cells.

Key words: VEGF, VEGFR2, angiogenesis, inhibitors of angiogenesis, brain tumors, site-directed therapy.

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2013; 11: 104–114)

неконтролируемым ростом, высокой частотой послеоперационных рецидивов, высоким уровнем васкуляризации и активным ангиогенезом, инвазивным характером роста по перивазальным и периневральным пространствам, а также резистентностью к химио- и радиотерапии [1–6]. В настоящее время традиционные схемы лечения остаются малоэффективными, а средняя выживаемость при мультиформной глиобластоме составляет менее 15 мес. Сложившаяся проблема ставит новые задачи по изучению стратегий избирательного ингибирования критических стадий опухолевой прогрессии.

Физиологический ангиогенез — процесс образования и формирования новых кровеносных сосудов, который активно протекает как в пре-, так и постнатальном онтогенезе, в то время как патологический, часто нерегулируемый ангиогенез приводит к образованию неопластической сосудистой сети, которая обеспечивает кровоснабжение малигнизированной ткани [3].

Принимая во внимание сказанное выше, нетрудно представить очевидную привлекательность терапевтических подходов, направленных на ингибирование процессов патологического ангиогенеза, в особенности в случае глиобластом — высоко васкуляризованных опухолей, характеризующихся активацией большого числа проангиогенных сигнальных механизмов [7, 8]. В связи с этим многообещающими с позиций специфического подавления опухоль-ассоциированного ангиогенеза являются препараты моноклональных антител, рекомбинантных рецепторов и низкомолекулярных ингибиторов. По механизму действия их можно разделить на блокаторы лиганда (бевацизумаб, афлиберцепт), блокаторы экстраклеточного фрагмента рецептора (рамуцирумаб) и ингибиторы каталитической активности внутриклеточного фрагмента рецептора (цедираниб, сунитиниб, сорафениб). В этом аспекте перспективной мишенью для подавления патологического ангиогенеза является рецептор II типа фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2) [9], который осуществляет основную функцию передачи VEGF-опосредуемого сигнала.

Ангиогенез

Ангиогенез контролируется динамическим равновесием про- и антиангиогенных факторов, концентрация которых зависит от потребностей ткани. Ангиогенез активируется в период эмбриогенеза, роста, регенеративных процессов и подавляется после формирования функциональной сосудистой сети. Подобное управление осуществляется с помощью сигнальных молекул, среди которых про- (VEGF, Ang1, Ang2, PDGF, TGF- α , bFGF) и антиангиогенные факторы (ангиостатин, эндостатин, TSP-1). Ключевыми регуляторами роста сосудистой сети являются VEGF-A и его тирозинкиназные рецепторы VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (KDR) [10–12]. VEGF/VEGFR2-опосредованная трансдукция сигнала запускает внутриклеточные сигнальные пути (PI3K/Akt, MAPK, eNOS, FAK и др.), которые активируют пролиферацию, синтез антиапоптотических белков, клеточную миграцию и повышение проницаемости сосудов [13]. Рецептор VEGFR2 преимущественно представлен на эндотелиальных клетках, в то время как VEGF секретируется клетками той ткани, которая нуждается в кровоснабжении (макрофаги, астроциты, кардиомиоциты и др.). Таким образом, при недостаточном кровоснабжении и оксигенации ткани клетки передают сигнал на эндотелиоциты, активируя ангиогенез. В результате происходит рост

и ветвление сосудов, увеличивается просвет и повышается их проницаемость. Помимо пролиферации эндотелиальных клеток близлежащих сосудов важную роль в ангиогенезе выполняют эндотелиальные прогениторные и гематопоэтические клетки, которые мигрируют из костного мозга в очаги ангиогенеза.

Уровень оксигенации ткани является основным движущим фактором ангиогенных процессов. При гипоксии снижается активность пролил-гидроксилаз, которые являются сенсорами молекул кислорода, что препятствует убиквитинизации и деградации гипоксия-индуцибельных транскрипционных факторов HIF1 α и HIF2 α , которые запускают экспрессию HIF-опосредованных генов, включая ген *VEGF* [14]. Кроме того, синтез VEGF регулируется и другими факторами, такими как ацидоз, воспалительные цитокины, факторы роста, половые гормоны и хемокины [15].

Хорошо известно, что многие солидные опухоли характеризуются интенсивным патологическим ангиогенезом [3]. Нерегулируемый ангиогенез приводит к образованию аномальной сосудистой сети, которая обеспечивает поступление кислорода и питательных веществ в малигнизированную ткань, а также способствует миграции и метастазированию опухолевых клеток [16, 17]. Иными словами, рост и развитие солидных опухолей в значительной степени зависят от плотности сосудистой сети и активности ангиогенных процессов. Важно отметить, что неопластическая сосудистая сеть обладает рядом структурных и функциональных особенностей: сосуды расширены, извилистые, с хаотичным ветвлением; также в опухолевых сосудах нарушается взаимодействие эндотелиальных клеток с перicyтами [9, 18, 19]. Кроме того, высокая проницаемость опухолевых сосудов способствует накоплению жидкости в интерстициальном пространстве и образованию отека [9, 19, 20].

Структура и активность рецепторов семейства VEGFR

Рецепторы VEGF относятся к группе тирозинкиназных рецепторов и состоят из 4 основных участков: внеклеточного N-концевого лигандсвязывающего фрагмента, трансмембранного α -спирального участка, внутриклеточных тирозинкиназного и C-терминального доменов (рис. 1) [21]. Внеклеточный гликозилированный N-концевой фрагмент VEGFR2 и VEGFR1-рецепторов состоит из 7 иммуноглобулинподобных доменов (Ig-подобные домены). Взаимодействие VEGF с рецептором происходит во 2-м Ig-подобном домене для VEGFR1 и во 2–3-м домене в случае VEGFR2. Остальные внеклеточные домены участвуют в процессах активации и димеризации рецепторов [22, 23]. У рецепторов семейства VEGFR внутриклеточный околочелюстной регион является высококонсервативным [24].

Связывание лиганда вызывает конформационные изменения рецептора, открывая сайты димеризации, в результате формируются гомо- или гетеродимеры. Анализ комплекса VEGF/VEGFR2 показал, что VEGF-A связывается со 2-м и 3-м экстраклеточными Ig-подобными доменами мономерного рецептора и увеличивает вероятность взаимодействия 2-й субъединицы VEGFR2 с комплексом рецептор–лиганд, формируя мультимерный сигнальный кластер, который позволяет активировать киназные домены через ауто- и трансфосфорилирование остатков тирозина внутриклеточного фрагмента [25]. Таким образом, формируются участки для связывания

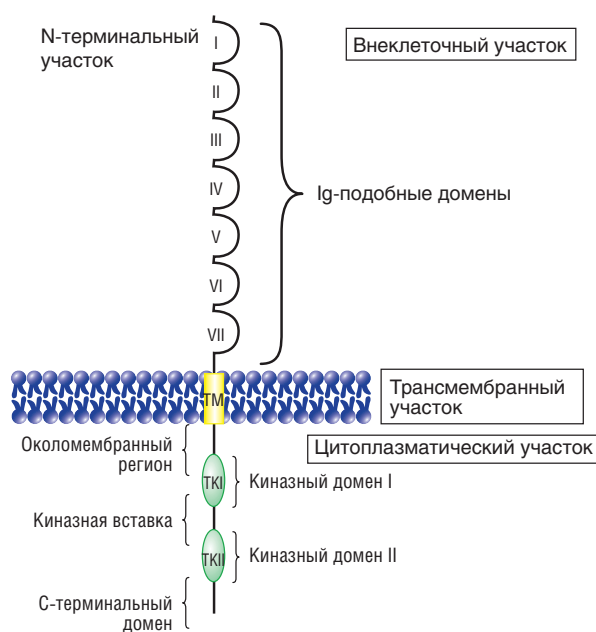


Рис. 1. Структурная организация рецепторов семейства VEGFR.

106

Примечание. Данные тирозинкиназные рецепторы состоят из внеклеточного N-концевого лигандсвязывающего участка, который образуют 7 Ig-подобных доменов, трансмембранного α-спирального домена, внутриклеточных тирозинкиназного и С-терминального участков. ТМ — трансмембранный домен; ТКИ и ТКII — тирозинкиназные домены I и II, соответственно.

внутриклеточных адапторных белков, содержащих SH2 (Src homology 2) или фосфотирозинсвязывающий домены, например VRAP (VEGF-рецепторассоциированный белок), Src-киназы, тирозинфосфатазы (PTP-тирозиновые фосфатазы), фосфолипаза C (PLCγ) и др. Связывание этих белков с фосфорилированными остатками тирозина запускает дальнейшую трансдукцию сигнала с участием вторичных мессенджеров [13]. В результате активируются такие сигнальные пути, как PI3K/Akt и Erk/MAPK, а также ряд регуляторных белков (eNOS, FAK, PLC-γ, Nck-1, Rac, HSP27 и др.). Каталитическая активность рецепторов VEGFR регулируется интернализацией и деградацией лиганд-рецепторного комплекса, а также дефосфорилированием тирозиновых остатков фосфатазами, такими как DEP1 (density enhanced phosphatase 1) и VEPTP (vascular endothelial PTP) [26]. Также продемонстрировано, что убиквитинизация внутриклеточного участка VEGFR2 приводит к эндосомальной и лизосомальной деградации лиганд-рецепторного комплекса [27].

Необходимо отметить, что большое значение при взаимодействии VEGF и его рецепторов играют протеоглики (HSPG). Благодаря отрицательным зарядам гепарансульфатов происходит их взаимодействие с факторами роста. Кроме того, 4-я Ig-подобная петля VEGFR1 и 6-7-я петли VEGFR2 также взаимодействуют с гепарансульфатами углеводов. От количества HSPG, представленного на клеточной поверхности эндотелиальных и периваскулярных клеток, зависит уровень и продолжительность активации рецепторов. Протеоглики при взаимодействии с VEGF-165 делают его более доступным для взаимодействия с рецептором VEGFR2, вызывая увеличение продолжительности сигнала и его амплитуды [28, 29].

Функции VEGFR1

VEGFR1 обладает наивысшей константой связывания с VEGF-A. Высокий уровень экспрессии VEGFR1 обнаружен в эндотелиальных клетках, моноцитах / макрофагах, трофобластах, гладкомышечных клетках кровеносных сосудов и дендритных клетках [30, 31]. Лигандами VEGFR1-рецептора служат VEGF-A, VEGF-B и PlGF [10, 13]. Полагают, что растворимый экстраклеточный фрагмент sVEGFR1 преимущественно выполняет функцию физиологического ингибитора VEGF, которая осуществляется посредством связывания лиганда без проведения внутриклеточного сигнала, функционируя подобно ловушке [32, 33].

В последнее время появляется все больше данных, подтверждающих опосредуемые VEGFR1 биологические эффекты. Несмотря на сниженную киназную активность, VEGFR1 может проводить внутриклеточный сигнал при взаимодействии с лигандом [34, 35]. Кроме того, VEGFR1 участвует в опухолевой прогрессии, активируя клеточную миграцию и инвазию некоторых линий опухолевых клеток через цитоплазматическую Src-киназу и ERK1/2 [36, 37]. Важно отметить, что VEGFR1-рецептор и гематопозитические клетки костного мозга могут играть ведущую роль в процессе формирования метастатической ниши, способствуя диссеминации малигнизированных клеток [38, 39].

Показано, что сниженная каталитическая активность VEGFR1 связана с утратой регуляторной функции С-терминального участка. Так, при замене С-терминального участка VEGFR1 на аналогичный участок VEGFR2 происходят аутофосфорилирование и активация рецептора, что приводит к проведению внутриклеточного сигнала, запускающего пролиферацию эндотелиальных клеток. Подавление киназной активности рецептора VEGFR1, возможно, связано с заменой высококонсервативного остатка аспарагиновой кислоты в регуляторной петле киназного домена на аспарагин [40]. Методом сайтнаправленного мутагенеза продемонстрировано, что остаток аспарагиновой кислоты в регуляторной петле способствует трансфосфорилированию остатков тирозина.

С другой стороны, биологическая активность VEGFR1 может регулироваться за счет гетеродимеризации с другими рецепторами семейства тирозинкиназ и нейропилинами (NRP) [41] подобно рецепторам семейства ErbB (рецепторы семейства эпидермального фактора роста). В то же время трансдукция сигнала молекулой VEGFR1 зависит и от типа связавшегося лиганда. Так, PlGF конкурирует с VEGF-A за связывание с рецептором. Например, связывание двух лигандов VEGF/PlGF может способствовать гетеродимеризации комплексов между рецепторами VEGFR2, VEGFR1 и нейропилинами, которые, в свою очередь, могут запускать уникальные сигнальные пути, не способные активироваться только VEGF или PlGF. Таким образом, молекулярное окружение может детерминировать или модифицировать проведение внутриклеточного сигнала [42, 43].

VEGFR2 и его биологическая роль

Основным медиатором биологического действия VEGF-A является VEGFR2 (молекулярный вес 230 кДа). Рецептор VEGFR2 связывает все изоформы VEGF-A, а также протеолитически расщепленные VEGF-C и VEGF-D [10–12]. VEGFR2 обладает более

низкой аффинностью связывания с VEGF-A ($K_d = 75\text{--}125$ пМ) по сравнению с первым рецептором VEGFR1 ($K_d = 2\text{--}10$ пМ), однако при взаимодействии VEGFR2 с корецептором семейства коллапсин / семафоринов нейропилином-1 (NRP1) аффинность к VEGF-A возрастает на порядок. Считается, что NRP1 модулирует проведение внутриклеточного сигнала VEGFR2, приводя к увеличению клеточной миграции и выживаемости эндотелиальных клеток.

Связывание VEGF-A с экстраклеточным фрагментом VEGFR2-рецептора приводит к его гомо- или гетеродимеризации, активируя внутриклеточные сигнальные пути, запуская пролиферацию и миграцию эндотелиоцитов, повышая выживаемость и экспрессию антиапоптотических белков, а также увеличивая проницаемость микрососудов [13]. Следует отметить, что VEGFR2 играет центральную роль в эмбриональном ангиогенезе и гемопозе. Делеция гена *VEGFR2* (-/-) приводит к гибели эмбрионов мышей в период между 8-ми и 9-ми сут развития и сопровождается нарушением процесса васкулогенеза, отсутствием дифференцировки клеток эндотелия и гемопоза [44]. Таким образом, VEGFR2 является наиболее важным рецептором VEGF-зависимого ангиогенеза, который осуществляет трансдукцию сигнала в клетку.

Во взрослом организме VEGFR2 преимущественно экспрессируется эндотелиальными клетками, однако данный рецептор представлен также на циркулирующих эндотелиальных прогениторных клетках, на клетках протока поджелудочной железы, прогениторных клетках сетчатки глаза, мегакариоцитах, гематопоэтических стволовых клетках, астроцитах и нейронах [45, 46]. В тканях легкого, печени, почек и в жировой ткани взрослых мышей обнаружен VEGFR2, находящийся в конститутивно фосфорилированном состоянии [47].

Экспрессия VEGFR2 продемонстрирована как в клетках неопластического эндотелия [48], так и непосредственно в опухолевых клетках [49–53]. VEGFR2-опосредованные внутриклеточные сигналы достоверно приводят к увеличению выживаемости опухолевых клеток в условиях гипоксии и могут способствовать развитию более агрессивного фенотипа [54]. Показано, что интерлейкин 6 потенцирует экспрессию VEGFR2 опухолевыми клетками и интерстициальными клетками эпителия [55].

Рецептор VEGFR2 как мишень антиангиогенной терапии

Нерегулируемый ангиогенез — важный фактор развития опухолей. Высокая степень васкуляризации, с одной стороны, обеспечивает усиленное кровоснабжение и питание, а с другой — создает нишу для периваскулярного роста и распространения. Именно поэтому подходы, направленные на подавление ангиогенеза и регрессию патологических сосудов, рассматривают как важный инструмент в борьбе с онкологическими заболеваниями [1, 2, 9]. В настоящее время ряд антиангиогенных препаратов проходит клинические исследования (рис. 2). Среди них блокаторы лиганд-рецепторного взаимодействия (бевацизумаб, афлиберцепт, рамуцирумаб), к которым относятся моноклональные антитела и рекомбинантные фрагменты рецепторов, блокирующие активацию рецептора и трансдукцию сигнала. Другой тип препаратов — низкомолекулярные ингибиторы каталитической активности (цедираниб, сунитиниб, сорафениб), которые направлены на внутриклеточный домен тирозинкиназных рецепторов.

Поскольку VEGFR2 — это основной рецептор проведения проангиогенного сигнала в эндотелиоцитах, он является важной мишенью для ингибирования ангиогенеза [56, 57]. В случае экспрессии VEGFR2 опухолевыми клетками секретируемый VEGF действует непосредственно как аутокринный фактор, запуская пролиферацию и повышая их выживаемость. В связи с этим специфические моноклональные антитела к экстраклеточному фрагменту VEGFR2 прецизионно изучают с позиций возможности подавления неопластического ангиогенеза [9, 58].

Рамуцирумаб (IMC-1121B) представляет собой моноклональные гуманизированные антитела к VEGFR2. Данный препарат высокоаффинно взаимодействует с VEGF-связывающим доменом VEGFR2-рецептора, блокируя лиганд-рецепторное взаимодействие в концентрациях от 0,8 до 1 нМ, в результате чего предотвращается трансдукция клеточного сигнала. Препараты на клеточных культурах и на моделях солидных опухолей показали, что рамуцирумаб специфично взаимодействует с VEGFR2-рецептором, ингибируя VEGF- и PlGF-зависимую активацию сигнальных путей, приводящую к миграции и пролиферации клеток [59–61]. В настоящее время препарат рамуцирумаб проходит III фазу клинических испытаний. Существуют и другие ингибиторы VEGFR2 на основе антител. CDP791 — ПЭГилированный бивалентный Fab-фрагмент, высокоаффинно связывающий VEGFR2. В I фазе исследований показано, что CDP791 при взаимодействии с рецептором препятствует его фосфорилированию и блокирует проведение клеточного сигнала [62].

Противоопухолевые эффекты моноклональных антител к VEGFR2 изучены на моделях рака легких, колоректального рака и глиобластомы [63–66]. Анти-VEGFR2-терапия приводила к уменьшению плотности и диаметра сосудов, увеличению числа перичитов на стенках капилляров, нормализации структуры базальной мембраны, повышению экспрессии коллагена IV типа, а также к снижению проницаемости сосудов и интерстициального давления. Более того, на ортотопической модели глиомы продемонстрирован синергический эффект при комбинировании радиотерапии и анти-VEGFR2-антител [65, 66].

Помимо исследования эффектов моноклональных анти-VEGFR2-антител, также изучают ингибиторы VEGFR1. Моноклональные антитела к VEGFR1 (IMC-18F1) блокируют трансдукцию сигнала рецептором VEGFR1 в клетках рака молочной железы *in vitro* и ингибируют рост опухоли *in vivo* [67]. Механизм действия IMC-18F1 аналогичен рамуцирумабу: антитела связывают VEGFR1 и препятствуют взаимодействию с VEGF-A, VEGF-B и PlGF.

Для антиангиогенной терапии опухолей разработан ряд низкомолекулярных ингибиторов тирозинкиназных рецепторов семейства VEGFR; некоторые из которых одобрены для использования в клинической практике (сунитиниб, сорафениб и пазопаниб). Механизм их действия отличается от действия антител. Во-первых, эти соединения ингибируют каталитическую активность внутриклеточного домена рецептора. Во-вторых, ингибиторы тирозинкиназ обладают более широким спектром действия, связываясь с несколькими типами рецепторов. Доклинические исследования показали структурные и функциональные изменения в сосудах [15]. Однако на стадии клинических испытаний тирозинкиназные ингибиторы в комбинации с химиотерапией оказались недостаточно эффективными. Кроме того, ингибиторы тирозинкиназ имеют более выраженную токсичность и низкое время циркуляции в крови.

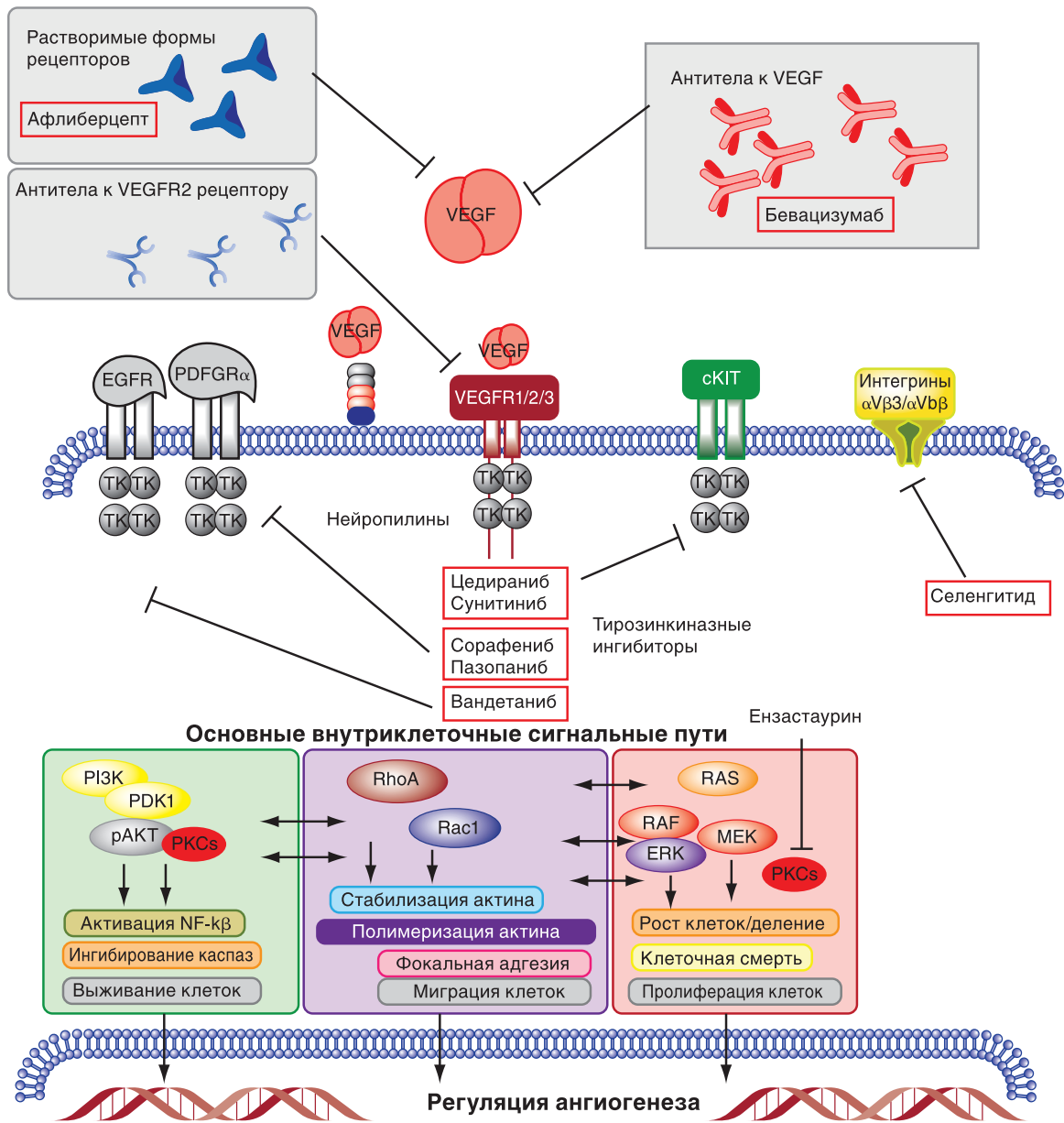


Рис. 2. Механизм действия антиангиогенных препаратов, направленных на подавление сигнальных путей эндотелиальных клеток.

Примечание. По механизму действия антиангиогенные препараты можно разделить на блокаторы лиганд-рецепторного взаимодействия, которые предотвращают активацию рецептора и трансдукцию сигнала (бевацизумаб, афлиберцепт, рамуцирумаб), и низкомолекулярные ингибиторы каталитической активности внутриклеточного фрагмента рецептора (цедираниб, сунитиниб, сорафениб).

Механизмы резистентности при антиангиогенной терапии

Анти-VEGFR2- и VEGF-антитела способны подавлять образование новых сосудов, а следовательно, питание и оксигенацию малигнизированной ткани, тем самым ограничивая рост опухоли и индуцируя апоптотическую гибель глиомных клеток [8, 68]. Однако нередко в условиях проводимой антиангиогенной терапии опухоль продолжает интенсивно развиваться [1, 2, 9, 69–71]. Такая устойчивость опухолей мозга, особенно высокоагрессивных, связана с удивительным многообразием механизмов адаптации. Принято вы-

делять ряд потенциальных механизмов формирования устойчивости [72].

Ключевым механизмом в восстановлении неопластического ангиогенеза является активация альтернативных сигнальных путей (bFGF, SDF1 α , PDGF-C) [73, 74] и усиление экспрессии проангиогенных факторов (VEGF-A, -B, -C, PlGF, VEGFR2, интерлейкин 8, HIF1 α) [75–77]. В связи с этим существуют все основания предполагать, что комбинация анти-VEGF- и анти-VEGFR-препаратов, а также применение ингибиторов альтернативных проангиогенных путей могут значительно повысить эффективность терапии опухолей. Другой механизм предполагает увеличение плотности перicyтов и восстановление

их протекторной функции по отношению к эндотелиоцитам [78], что стабилизирует микрососуды и способствует ревазуляризации. Миграция миелиодных предшественников эндотелиальных клеток и моноцитов из костного мозга в опухолевый очаг также вносит вклад в восстановление неоангиогенеза [79]. Этот механизм восполнения клеток эндотелия частично зависит от HIF1 α -индуцированной стимуляции SDF1 α .

Показано, что компенсаторные механизмы сосудистой поддержки в GBM в ответ на антиангиогенную терапию могут быть связаны с эндотелиальными клетками опухолевого происхождения, которые образуются в результате трансдифференцировки [80, 81]. Этот феномен хорошо известен как мозаичность сосудов. Важными факторами такой дифференциации являются условия гипоксии и регуляторный белок HIF1 α . В то же время этот процесс не зависит от VEGF, поэтому эндотелиальные клетки опухолевого происхождения устойчивы к ингибиторам VEGF и могут быть одним из факторов резистентности опухолей.

Установлено, что антиангиогенная терапия вызывает гипоксию, приводящую к стабилизации HIF1 α [82], метаболическому переходу к гликолизу, активации PI3K- и Wnt-сигнальных путей, уменьшению числа митохондрий [70]. Также обнаружена положительная регуляция и других ангиогенезозависимых генов, включая *VEGF-A*, который активирует различные сигнальные пути. Так, активация PI3K/Akt в условиях гипоксии приводит к увеличению внутриклеточного уровня глюкозы [83], стимуляции гликолиза и накоплению молочной кислоты, вследствие чего запускается инвазия и метастазирование. В то же время происходит снижение чувствительности малигнизированных клеток к гипоксии, что результирует в повышению резистентности к антиангиогенной терапии [84].

Наиболее опасными последствиями антиангиогенной терапии являются активация механизмов инвазии, рост опухоли вдоль окружающих кровеносных сосудов и метастазирование [70, 85–87]. Подавление ангиогенеза снижает оксигенацию малигнизированной ткани и приводит к гипоксии. В неблагоприятных условиях и при отсутствии ангиогенеза опухоль может переключиться на инвазивный механизм развития [88]. Продемонстрировано, что антиангиогенная терапия приводит к активации инвазии и периваскулярного роста [86], потенцированию PI3K- и Wnt-сигнальных путей [70], а также к усилению экспрессии матриксных металлопротеиназ [89].

Принято считать, что в основе малигнизации лежит нестабильность генома, которая приводит к генетической неоднородности и разнообразию, мутациям и селекции агрессивных опухолевых клонов [90]. Помимо резистентности, обусловленной самими малигнизированными клетками, важное значение в опухолевой прогрессии принадлежит клеточному микроокружению, которое составляют неопластические эндотелиоциты, клетки паренхимы, иммунные клетки и опухоль-ассоциированные фибробласты. Важно отметить, что нормальные клетки репрограммируются и регулируются опухолевыми клетками, в результате способствуя их росту и выживанию.

Гематопоэтические клетки костного мозга и VEGFR1-рецептор могут играть ведущую роль в процессе формирования премегастатической ниши, способствуя диссеминации малигнизированных клеток [91, 92]. Прогениторные гематопоэтические VEGFR1-позитивные клетки костного мозга мигрируют в различные ткани, образуя клеточные кластеры, называемые премегастатической нишей для злокачественных клеток. Исследования

на мышах показали, что при введении анти-VEGFR1- или анти-VEGFR2-антител наблюдалось снижение интенсивности метастазирования, а введение одновременно антител против VEGFR1 и VEGFR2-рецепторов блокировало не только метастазирование, но и развитие клеточных кластеров перед началом миграции опухолевых клеток. Таким образом, процесс метастазирования злокачественных клеток можно описать как цепь молекулярных событий, запускаемых факторами, синтезируемыми опухолью, прежде всего VEGF и VEGFR1-рецепторами, и обуславливающими повышенную экспрессию факторов хемотаксиса для гемопоэтических клеток костного мозга в органе-мишени. Хемотаксическое наведение VEGFR1-позитивных прогениторных клеток в орган сопровождается деградацией межклеточного матрикса и адгезией этих клеток, формируя благоприятное микроокружение для опухолевых клеток. Затем активируются процессы миграции VEGFR2-позитивных клеток, запускающих ангиогенез. В результате этих событий происходит миграция злокачественных клеток, образующих метастазы.

Другой пример поддержки опухоли клетками нормальной ткани — т.н. астроглиальный вал. В перитуморальном пространстве опухолей мозга повреждение нервной ткани запускает экспрессию VEGF и VEGFR2 реактивными астроцитами и репаративный ангиогенез [93, 94]. С одной стороны, это может оказывать прямую митогенную и ангиопоэтическую поддержку опухолевым и эндотелиальным клеткам, с другой — рост кровеносных сосудов обеспечивает поступление питательных веществ и создает благоприятные условия для миграции глиомных клеток из опухолевого очага в паренхиму нервной ткани.

Одним из определяющих факторов развития онкологических заболеваний принято считать феномен угнетения иммунитета. Установлено, что эффекторные и регуляторные иммунные клетки опухолевого окружения являются ключевым фактором развития новообразований. Микроокружение опухоли выделяет факторы иммуносупрессии, в т.ч. для подавления дендритных и Т-клеток [95]. Например, VEGF препятствует дифференцировке гемопоэтических предшественников в дендритные клетки [96], что может быть одним из факторов иммуносупрессии. Дендритные клетки являются мощными стимуляторами первичного иммунного ответа и обладают способностью презентировать антигены Т-клеткам, стимулируя их дифференцировку в антиген-специфические цитотоксические лимфоциты. Показано, что дендритные клетки онкологических больных обладают сниженной антигенпрезентирующей способностью вследствие снижения уровня экспрессии CD80 и CD86 [97]. С другой стороны, опухоль-ассоциированные регуляторные дендритные клетки способны поляризовать Т-клетки и поддерживать их невосприимчивость. Управление дифференциацией и активностью регуляторных Т-клеток (Treg) и супрессорных клеток костного мозга (миелоидные супрессорные клетки) приводит к подавлению противоопухолевого иммунитета [95].

Таким образом, клинические и экспериментальные исследования свидетельствуют об ограниченной эффективности антиангиогенной терапии в случае опухолей мозга [1, 2, 8, 9], поэтому необходимо продолжать поиск альтернативных подходов противоопухолевой терапии. Одним из многообещающих направлений повышения эффективности лечения опухолей мозга следует считать адресную высокоселективную доставку наноразмерных контейнерных систем векторного типа.

Высокоселективные контейнерные системы

Хорошо известно, что опухоли мозга характеризуются высокой степенью васкуляризации, повышенной проницаемостью сосудов и нарушением целостности гематоэнцефалического барьера [98–100]. Эти особенности могут быть использованы для селективного транспорта наноразмерных систем в малигнизированную ткань. В связи с этим принципиально новым направлением может стать внедрение контейнерных систем на основе антител для высокоселективного направленного транспорта лекарственных средств [101–105].

Структура гематоэнцефалического барьера в значительной мере ограничивает проникновение макромолекул в паренхиму нервной ткани. Однако в результате ряда патологических процессов целостность барьера может нарушаться [98–100, 106]. Известно, что VEGF и его рецептор VEGFR2 являются регуляторами проницаемости микрососудов [2, 8, 10, 11]. Важно отметить, что увеличение уровня экспрессии проангиогенных молекул является одним из факторов повышения проницаемости церебральных микрососудов. В основе данного эффекта лежит VEGF/VEGFR2-опосредованный механизм подавления экспрессии белков плотных контактов эндотелиоцитами, в частности окклюдина [107], а также реорганизация белков цитоскелета, вызывающая ослабление адгезии между VE-кадгеринами [108]. В нервной ткани VEGF и VEGFR2 экспрессируются астроцитами и нейронами [93, 94, 109], при этом в определенных условиях уровень их экспрессии реактивными астроцитами значительно возрастает. Повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера имеет место при ряде патологических процессов, таких как злокачественные новообразования, инфаркты мозга, болезнь Альцгеймера, травмы мозга и бактериальные абсцессы [93, 100, 106].

Нарушение структуры гематоэнцефалического барьера приводит к повышению его проницаемости, позволяя наноразмерным частицам проникать из кровотока в патологическую ткань. Следовательно, нарушение барьера можно рассматривать как элемент селективности, который способствует накоплению наноразмерных частиц в патологическом очаге. В качестве наноразмерных контейнеров для направленного транспорта лекарств используют липосомы, мицеллы, дендримеры, блоксополимерные контейнеры, фуллерены и углеродные нанотрубки [110]. Основная функция таких систем заключается в замедлении разрушения и выведения лекарства из организма, а также в пролонгировании времени его высвобождения. В результате увеличивается время воздействия на клетки мишени и снижается системная токсичность препаратов с низким терапевтическим индексом [111].

В клинической практике широко применяется только один тип наноконтейнеров — липосомы, нагруженные противоопухолевыми препаратами. Липосомальные формы в некоторых случаях имеют ряд преимуществ по сравнению со свободной формой препарата. Например, липосомальный доксорубицин характеризуется меньшей кардиотоксичностью и улучшенной фармакокинетикой [111]. В клинических исследованиях было показано, что эффективность противоопухолевой терапии липосомальным доксорубицином (Caelyx и Doxil) была сопоставима или даже превышала показатели свободной формы препарата. В настоящее время на фармацевтическом рынке представлен ряд липосомальных препаратов: доксорубицин, даунорубицин, цитарабин и др. [112]. Еще больше препаратов проходят клинические испытания (прежде всего это цисплатин, иринотекан, паклитаксел, топо-

текан и др.). Таким образом, контейнерные системы — перспективное и активно развивающееся направление, позволяющее в зависимости от цели подобрать наиболее подходящий контейнер и загрузить его биологически активным веществом.

Однако пассивная доставка контейнеров, нагруженных лекарствами, не решает основной задачи — избирательного транспорта в клетки-мишени. Поэтому в последнее время изучают векторные контейнерные системы на основе антител к опухоли-ассоциированным белкам, таким как Her-2 [113], EGFR [114], GFAP и Cx-43 [102], VEGF [115] и VEGFR2 [116]. Векторизация контейнеров моноклональными антителами позволяет получить систему для адресной доставки лекарств. Данный подход основан на специфическом взаимодействии векторной молекулы с антигенами клеток-мишеней, что приводит к селективному накоплению и захвату контейнеров опухолевыми клетками. Таким образом, для направленного транспорта существует проблема выбора мишени, которая была бы, с одной стороны, специфична, а с другой — гиперэкспрессирована опухолевыми клетками. Известно, что рецептор VEGFR2 представлен на неопластических сосудах, а также гиперэкспрессирован рядом опухолей [49–53]. Кроме того, VEGFR2 имеет большое значение для неопластического ангиогенеза и модуляции проницаемости сосудов [10–13]. Следовательно, он может быть использован в качестве молекулярной мишени для направленной доставки лекарств в неопластические сосуды и опухолевые клетки.

В исследованиях на мышах было показано, что противоопухолевая терапия анти-VEGFR2-иммунолипосомами с доксорубицином оказалась более эффективной по сравнению с не векторной липосомальной формой доксорубицина [116]. Объяснимо, что эффективность такой антиангиогенной терапии была выше при высоко васкуляризированных опухолях.

Можно предположить, что применение молекулярных векторов позволит повысить эффективность и селективность направленного транспорта лекарств в клетки-мишени. Прогресс в области биотехнологического дизайна систем направленного транспорта на основе наноконтейнеров и специфических молекулярных векторов может значительно повысить эффективность противоопухолевой химиотерапии.

Заключение

Проведение клеточных сигналов рецептором VEGFR2 играет ключевую роль в неопластическом ангиогенезе [10–12]. VEGFR2 считается главным рецептором VEGF-опосредуемого пути, который активирует трансдукцию сигнала в эндотелиальных клетках, в то время как VEGFR1 может быть как положительным, так и отрицательным регулятором ангиогенеза. Проведение сигналов VEGFR-рецепторами регулируется не только взаимодействием с лигандами, но также и другими белками, такими как интегрины, нейропилины и протеогликаны. Кроме того, в некоторых случаях растворимые формы рецепторов семейства VEGFR могут служить маркерами прогноза развития опухолей и оценки степени их злокачественности [117]. Детальное изучение молекулярных механизмов регуляции и трансдукции проангиогенных сигналов VEGFR1 и VEGFR2 позволит разработать более эффективные терапевтические подходы.

Ингибиторы VEGFR2 препятствуют активации и трансдукции сигнала, подавляя пролиферацию, ми-

грацию и выживаемость эндотелиоцитов, блокируя рост кровеносных сосудов. Анти-VEGFR2-терапия приводит к регрессии сосудистой сети, снижению плотности и диаметра сосудов в опухоли, увеличению числа перicyтов на стенках капилляров, к нормализации структуры базальной мембраны, повышению уровня экспрессии коллагена IV типа, а также к снижению проницаемости сосудов и интерстициального давления [9, 58–67], таким образом замедляя рост опухоли.

В настоящее время проходят клинические испытания препараты, направленные на селективное подавление ангиогенеза, из них наиболее широкое распространение получили препараты моноклональных антител, которые специфичны либо к внеклеточному домену рецептора (рамуцирумаб), либо к самому лиганду (бевацизумаб) и направлены на ингибирование связывания лиганда с рецептором. Несмотря на ряд преимуществ антиангиогенных препаратов, подавление функций одной мишени не всегда позволяет эффективно сдерживать рост сосудистой сети и опухоли [8]. Эффективность такой схемы лечения индивидуальна и зависит от конкретной опухоли. Целесообразность применения ингибиторов VEGF и VEGFR2 должна определяться в соответствии с зависимостью опухолевых клеток от VEGF/VEGFR2-регуляции и возможности быстро адаптироваться. Резистентность к антиангиогенной терапии связана с повышением уровня экспрессии факторов роста и с активацией альтернативных проангиогенных путей [73–77], привлечением предшественников эндотелиальных клеток из костного мозга [79], увеличением вклада периваскулярного инвазивного роста в прогрессию опухоли [70, 72, 85–87] и переключением на анаэробный метаболизм глюкозы. Подавление ангиогенеза приводит к изменению условий микроокружения и метаболическим перестройкам, что может стимулировать клетки глиомы к миграции за

пределы опухолевого очага, активируя инвазивный рост опухоли в окружающие ткани.

Таким образом, ангиогенез — это чрезвычайно важный, но не единственный фактор прогрессии опухолей. Туморогенез представляет собой многоступенчатый процесс взаимосвязи между гетерогенной популяцией опухолевых клеток и компонентов микроокружения [118], также включающий адаптивную регуляцию различных сигнальных путей. В связи с этим для повышения эффективности противоопухолевой терапии ингибиторы VEGFR2, VEGF и другие антиангиогенные препараты должны применяться комплексно. Так, традиционные химиотерапевтические препараты, такие как темозоломид, иринотекан и доксорубин, подавляют репликацию ДНК и пролиферацию. Добавление к традиционным схемам лечения анти-VEGFR2-препаратов вместе с анти-VEGF-антителами может повысить эффективность терапии и выживаемость пациентов. Было продемонстрировано повышение эффективности антиангиогенной терапии вместе с ингибированием PDGFR- β [119], VEGFR1 и CXCR4 [120], HIF1 α [121].

Проблема эффективной терапии резистентных опухолей (в особенности мультиформных глиобластом) остается актуальной. Наиболее многообещающей представляется мультитаргетная стратегия, включающая в себя комплекс препаратов, направленных на критические процессы опухолевого роста и развития [122]. Наиболее клинически значимыми особенностями опухолей являются инвазия, метастатическое распространение, ангиогенез и высокая резистентность. Именно поэтому разработка препаратов, ограничивающих ангиогенез, иммуносупрессию, миграцию, пролиферацию и выживаемость опухолевых клеток, а также подбор их оптимального сочетания для каждого конкретного опухолевого типа позволят оптимизировать терапевтические подходы.

REFERENCES

- Norden A.D., Drappatz J., Wen P.Y. Antiangiogenic therapies for high-grade glioma. *Nat. Rev. Neurol.* 2009; 5 (11): 610–620.
- Miletic H., Niclou S.P., Johansson M., Bjerkvig R. Anti-VEGF therapies for malignant glioma: treatment effects and escape mechanisms. *Expert. Opin.* 2009; 13(4): 455–468.
- Jain R.K., di Tomaso E., Duda D.G., Loeffler J.S., Sorensen A.G., Batchelor T.T. Angiogenesis in brain tumours. *Nat. Rev. Neurosci.* 2007; 8 (8): 610–622.
- Lakka S.S., Rao J.S. Antiangiogenic therapy in brain tumors. *Exp. Rev. Neurother.* 2008; 8 (10): 1457–1473.
- Stewart L.A. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet.* 2002; 359 (9311): 1011–1018.
- Zalutsky M.R. Current status of therapy of solid tumors: brain tumor therapy. *J. Nucl. Med.* 2005; 1: 151–156.
- Gerstner E.R., Batchelor T.T. Antiangiogenic therapy for glioblastoma. *Cancer J.* 2012; 18 (1): 45–50.
- Chekhonin V.P., Shein S.A., Korchagina A.A., Gurina O.I. VEGF in neoplastic angiogenesis. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* 2012; (2): 23–33.
- Tong R.T., Boucher Y., Kozin S.V., Winkler F., Hicklin D.J., Jain R.K. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer. Res.* 2004; 64: 3731–3736.
- Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 2003; 9 (6): 669–676.
- Ferrara N., Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 1997; 18 (1): 4–25.
- Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J. Mol. Med.* 1999; 77 (7): 527–543.
- Holmes K., Roberts O.L., Thomas A.M., Cross M.J. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal.* 2007; 19 (10): 2003–2012.
- Semenza G.L., Wang G.L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 1992; 12: 5447–5454.
- Goel S., Duda D.G., Xu L., Munn L.L., Boucher Y., Fukumura D. et al. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol. Rev.* 2011; 91 (3): 1071–1121.
- Lee S.L., Rouhi P., Dahl Jensen L., Zhang D., Ji H., Hauptmann G. et al. Hypoxia-induced pathological angiogenesis mediates tumor cell dissemination, invasion, and metastasis in a zebrafish tumor model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2009; 106 (46): 19485–19490.
- Liu W., Xu J., Wang M. et al. Tumor-derived vascular endothelial growth factor (VEGF)-a facilitates tumor metastasis through the VEGF-VEGFR1 signaling pathway. *Int. J. Oncol.* 2011; 39 (5): 1213–1220.
- Jain R.K. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat. Med.* 2001; 7 (9): 987–989.
- Jain R.K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science.* 2005; 307 (5706): 58–62.
- Stohrer M., Boucher Y., Stangassinger M., Jain R.K. et al. Oncotic pressure in solid tumors is elevated. *Cancer. Res.* 2000; 60: 4251–4255.

21. Hubbard S.R. Autoinhibitory mechanisms in receptor tyrosine kinases. *Front Biosci*. 2002; 7: 330–340.
22. Keyt B.A., Nguyen H.V., Berleau L.T., Duarte C.M., Park J., Chen H. et al. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 5638–5646.
23. Shinkai A., Ito M., Anazawa H., Yamaguchi S., Shitara K., Shibuya M. et al. Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 31283–31288.
24. Heldin C.H., Westermark B. Mechanism of action and *in vivo* role of platelet-derived growth factor. *Physiol. Rev.* 1999; 79 (4): 1283–1316.
25. Ruch C., Skiniotis G., Steinmetz M.O., Wälz T., Ballmer-Hofer K. et al. Structure of a VEGF-VEGF receptor complex determined by electron microscopy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007; 14 (3): 249–250.
26. Kappert K., Peters K.G., Bohmer F.D., Ostman A. et al. Tyrosine phosphatases in vessel wall signaling. *Cardiovasc. Res.* 2005; 65 (3): 587–598.
27. Ewan L.C., Jopling H.M., Jia H., Mittar S., Bagherzadeh A., Howell G.J. et al. Intrinsic tyrosine kinase activity is required for vascular endothelial growth factor receptor 2 ubiquitination, sorting and degradation in endothelial cells. *Traffic*. 2006; 7 (9): 1270–1282.
28. Koch S., Tugues S., Li X., Gualandi L., Claesson-Welsh L. et al. Signal transduction by vascular endothelial growth receptors. *Biochem. J.* 2011; 437: 169–183.
29. Jakobsson L., Kreuger J., Holmborn K., Lundin L., Eriksson I., Kjellen L. et al. Heparan sulfate in trans potentiates VEGFR-mediated angiogenesis. *Dev. Cell.* 2006; 10 (5): 625–634.
30. Grosskreutz C.L., Anand-Apte B., Duplaa C., Quinn T.P., Terman B.I., Zetter B. et al. Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Microvasc. Res.* 1999; 58 (2): 128–136.
31. Sawano A., Iwai S., Sakurai Y., Ito M., Shitara K., Nakahata T. et al. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood*. 2001; 97 (3): 785–791.
32. Hiratsuka S., Minowa O., Kuno J., Noda T., Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95 (16): 9349–9354.
33. Fong G. H., Rossant J., Gertsenstein M., Breitman M.L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995; 376 (6535): 66–70.
34. Wang F., Yamauchi M., Muramatsu M., Osawa T., Tsuchida R., Shibuya M. RACK1 regulates VEGF/Flt1-mediated cell migration via activation of a PI3-K/Akt pathway. *J. Biol. Chem.* 2011; 286 (11): 9097–9106.
35. Cai J., Ahmad S., Jiang W.G., Huang J., Kontos C.D., Boulton M. Activation of vascular endothelial growth factor receptor-1 sustains angiogenesis and Bcl-2 expression via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in endothelial cells. *Diabetes*. 2003; 52 (12): 2959–2968.
36. Taylor A. P., Leon E., Goldenberg D. Placental growth factor (PlGF) enhances breast cancer cell motility by mobilising ERK1/2 phosphorylation and cytoskeletal rearrangement. *Brit. J. Cancer*. 2010; 103 (1): 82–89.
37. Wey J.S., Fan F., Gray M.J., Bauer T.W., McCarty M.F., Somcio R. et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer*. 2005; 104: 427–438.
38. Lyden D., Hattori K., Dias S. et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nature Med.* 2001; 7: 1194–1201.
39. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2006; 39 (5): 469–478.
40. Meyer R.D., Mohammadi M., Rahimi N. A single amino acid substitution in the activation loop defines the decoy characteristic of VEGFR-1/FLT-1. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 867–875.
41. 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 (22): 16986–16992.
42. Autiero M., Waltenberger J., Communi D., Kranz A., Moons L., Lambrechts D. et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat. Med.* 2003; 9: 936–943.
43. Cleaver O., Melton D.A. Endothelial signaling during development. *Nat. Med.* 2003; 9: 661–668.
44. Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T.P., Gertsenstein M., Wu X.F., Breitman M.L. et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995; 376: 62–66.
45. Hicklin D.J., Ellis L.M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 1011–1027.
46. Oelrichs R.B., Reid H.H., Bernard O., Ziemiecki A., Wilks A.F. NYK/FLK-1: a putative receptor protein tyrosine kinase isolated from E10 embryonic neuroepithelium is expressed in endothelial cells of the developing embryo. *Oncogene*. 1993; 8: 11–18.
47. Maharaj A.S., Saint-Geniez M., Maldonado A.E., D'Amore P.A. Vascular endothelial growth factor localization in the adult. *Am. J. Pathol.* 2006; 168: 639–648.
48. Smith N.R., Baker D., James N.H., Ratcliffe K., Jenkins M., Ashton S.E. et al. Vascular endothelial growth factor receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 are localized primarily to the vasculature in human primary solid cancers. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 3548–3561.
49. Zozulia U., Vasilyeva I., Slin'ko E., Chopick N. Comparative study of vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in spinal tumors. *Ukr. Neurosci. J.* 2001; 3: 85–92.
50. Plate K.H., Breier G., Millauer B., Ullrich A., Risau W. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 1993; 53 (23): 5822–5827.
51. Podar K., Anderson K.C. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood*. 2005; 105: 1383–1395.
52. Dias S., Hattori K., Zhu Z., Heissig B., Choy M., Lane W. et al. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *J. Clin. Invest.* 2000; 106 (4): 511–521.
53. Hicklin D.J., Ellis L.M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 1011–1027.
54. Calvani M., Rapisarda A., Uranchimeg B., Shoemaker R.H., Melillo G. Hypoxic induction of an HIF-1 α -dependent bFGF autocrine loop drives angiogenesis in human endothelial cells. *Blood*. 2006; 107: 2705–2712.
55. Waldner M.J., Wirtz S., Jefremow A., Wärntjen M., Neufert C., Atreya R. et al. VEGF receptor signaling links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer. *J. Exp. Med.* 2010; 207: 2855–2868.
56. Motzer R.J., Michaelson M.D., Redman B.G., Hudes G.R., Wilding G., Figlin R.A. et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24: 16–24.
57. de Boudard S., Herlin P., Christensen J.G., Lemoisson E., Gauduchon P., Raymond E. et al. Antiangiogenic and anti-invasive effects of sunitinib on experimental human glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2007; 9: 412–423.

58. Tvorogov D., Anisimov A., Zheng W., Leppanen V.M., Tammela T., Laurinavicius S. et al. Effective suppression of vascular network formation by combination of antibodies blocking VEGFR ligand binding and receptor dimerization. *Cancer Cell*. 2010; 18: 630–640.
59. Spratlin J. Ramucirumab (IMC-1121B): Monoclonal antibody inhibition of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Curr. Oncol. Rep.* 2011; 13 (2): 97–102.
60. Spratlin J.L., Mulder K.E., Mackey J.R. Ramucirumab (IMC-1121B): a novel attack on angiogenesis. *Future Oncol.* 2010; 6 (7): 1085–1094.
61. Krupitskaya Y., Wakelee H.A. Ramucirumab, a fully human mAb to the transmembrane signaling tyrosine kinase VEGFR-2 for the potential treatment of cancer. *Curr. Opin. Investig. Drugs*. 2009; 10 (6): 597–605.
62. Ton N.C., Parker G.J., Jackson A., Mullamitha S., Buonaccorsi G.A., Roberts C. et al. Phase I evaluation of CDP791, a PEGylated di-Fab' conjugate that binds vascular endothelial growth factor receptor 2. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13 (23): 7113–7118.
63. Hansen-Algenstaedt N., Stoll B.R., Padera T.P., Dolmans D.E., Hicklin D.J., Fukumura D. et al. Tumor oxygenation in hormone-dependent tumors during vascular endothelial growth factor receptor-2 blockade, hormone ablation, and chemotherapy. *Cancer Res.* 2000; 60: 4556–4560.
64. Juan T.Y., Roffler S.R., Hou H.S., Huang S.M., Chen K.C., Leu Y.L. et al. Antiangiogenesis targeting tumor microenvironment synergizes glucuronide prodrug antitumor activity. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 4600–4611.
65. Kozin S.V., Boucher Y., Hicklin D.J., Bohlen P., Jain R.K., Suit H.D. Vascular endothelial growth factor receptor-2-blocking antibody potentiates radiation-induced long-term control of human tumor xenografts. *Cancer Res.* 2001; 61: 39–44.
66. Winkler F., Kozin S.V., Tong R.T., Chae S.S., Booth M.F., Garkavtsev I. et al. Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell*. 2004; 6: 553–563.
67. Sullivan L.A., Brekken R.A. The VEGF family in cancer and antibody-based strategies for their inhibition. *MAbs*. 2010; 2 (2): 165–175.
68. Kim K.J., Li B., Winer J., Armanini M., Gillett N., Phillips H.S. et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*. 1993; 362: 841–844.
69. Carmeliet P., Jain R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000; 407: 249–257.
70. Keunen O., Johansson M., Oudin A., Sanzey M., Rahim S.A., Fack F. et al. Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011; 108 (9): 3749–3754.
71. Roodink I., Leenders W.P. Targeted therapies of cancer: angiogenesis inhibition seems not enough. *Cancer Lett.* 2010; 299 (1): 1–10.
72. Bergers G., Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat. Rev. Cancer*. 2008; 8 (8): 592–603.
73. di Tomaso E., London N., Fuja D., Logie J., Tyrrell J.A., Kamoun W. et al. PDGF-C induces maturation of blood vessels in a model of glioblastoma and attenuates the response to anti-VEGF treatment. *PLoS One*. 2009; 4 (4): e5123.
74. Batchelor T.T., Sorensen A.G., di Tomaso E., Ryg P.A., Loeffler J.S., Sorensen A.G. et al. AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell*. 2007; 11 (1): 83–95.
75. Mizukami Y., Jo W.S., Duerr E.M., Gala M., Li J., Zhang X. et al. Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1 α -deficient colon cancer cells. *Nature Med.* 2005; 11: 992–997.
76. Ali M.M., Janic B., Babajani-Feremi A., Varma N.R., Iskander A.S., Anagli J. et al. Changes in vascular permeability and expression of different angiogenic factors following anti-angiogenic treatment in rat glioma. *PLoS One*. 2010; 5 (1): 8727.
77. Fan F., Samuel S., Gaur P., Lu J., Dallas N.A., Xia L. et al. Chronic exposure of colorectal cancer cells to bevacizumab promotes compensatory pathways that mediate tumour cell migration. *Brit. J. Cancer*. 2011; 104 (8): 1270–1277.
78. Song S., Ewald A.J., Stallcup W., Werb Z., Bergers G. PDGFR β + perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nature Cell. Biol.* 2005; 7: 870–879.
79. Du R., Lu K.V., Petritsch C., Liu P., Ganss R., Passegue E. et al. HIF1 α induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell*. 2008; 13 (3): 206–220.
80. Wang R., Chadalavada K., Wilshire J., Kowalik U., Hovinga K.E., Geber A. et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature*. 2010; 468 (7325): 829–833.
81. Ricci-Vitiani L., Pallini R., Biffoni M., Todaro M., Invernici G., Cenci T. et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*. 2010; 468 (7325): 824–828.
82. Hendriksen E.M., Span P.N., Schuurung J., Peters J.P., Sweep F.C., van der Kogel A.J. et al. Angiogenesis, hypoxia and VEGF expression during tumour growth in a human xenograft tumour model. *Microvasc. Res.* 2009; 77 (2): 96–103.
83. Robey R.B., Hay N. Is Akt the «Warburg kinase»?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 2009; 19 (1): 25–31.
84. Yu J.L., Rak J.W., Coomber B.L., Hicklin D.J., Kerbel R.S. Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science*. 2002; 295 (5559): 1526–1528.
85. Calabrese C., Poppleton H., Kocak M., Hogg T.L., Fuller C., Hamner B. et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*. 2007; 11 (1): 69–82.
86. Paez-Ribes M., Allen E., Hudock J., Takeda T., Okuyama H., Vinals F. et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell*. 2009; 15 (3): 220–231.
87. Ebos J.M., Lee C.R., Cruz-Munoz W., Bjarnason G.A., Christensen J.G., Kerbel R.S. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell*. 2009; 15 (3): 232–239.
88. Bikfalvi A., Moenner M., Javerzat S., North S., Hagedorn M. Inhibition of angiogenesis and the angiogenesis/invasion shift. *Biochem. Soc. Trans.* 2011; 39 (6): 1560–1564.
89. Lucio-Eterovic A.K., Piao Y., de Groot J.F. Mediators of glioblastoma resistance and invasion during antivascular endothelial growth factor therapy. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15 (14): 4589–4599.
90. Wu X., Northcott P.A., Dubuc A., Dupuy A.J., Shih D.J., Witt H. et al. Clonal selection drives genetic divergence of metastatic medulloblastoma. *Nature*. 2012; 482 (7386): 529–533.
91. Lyden D., Hattori K., Dias S., Costa C., Blaikie P., Butros L. et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat. Med.* 2001; 7 (11): 1194–1201.
92. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2006; 39 (5): 469–478.
93. Salthia B., Angelov L., Roncari L., Wu X., Shannon P., Guha A. Expression of vascular endothelial growth factor by reactive astrocytes and associated neoangiogenesis. *Brain. Res.* 2000; 883 (1): 87–97.
94. Wuestefeld R., Chen J., Meller K., Brand-Saberi B., Theiss C. Impact of vegf on astrocytes: analysis of gap junctional intercellular communication, proliferation, and motility. *Glia*. 2012; 60 (6): 936–947.
95. Ma Y., Shurin G.V., Gutkin, D. W., Shurin M.R. Tumor associated regulatory dendritic cells. *Semin. Cancer Biol.* 2012; 22 (4): 298–306.

96. Gabrilovich D., Ishida T., Oyama T., Ran S., Kravtsov V., Nadaf S. et al. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages *in vivo*. *Blood*. 1998; 92: 4150–4166.
97. Chauv P., Moutet M., Faivre J., Martin F., Martin M. Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of the T-cell activation. *Lab. Invest.* 1996; 74 (5): 975–983.
98. Caraglia M., De Rosa G., Salzano G., Santini D., Lamberti M., Sperlongano P. et al. Nanotech revolution for the anti-cancer drug delivery through blood-brain-barrier. *Curr. Cancer Drug. Targets*. 2012; 12 (3): 186–196.
99. Zhan C., Lu W. The blood-brain/tumor barriers: challenges and chances for malignant gliomas targeted drug delivery. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2012; 13 (12): 2380–2387.
100. Chekhonin V.P., Baklaushev V.P., Yusubaliev G.M., Volgina N.E., Gurina O.I. Fundamental and applied aspects of the hematoencephalic barrier research. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* 2012; (8): 66–78.
101. Zhou J., Atsina K.B., Himes B.T., Strohhahn G.W., Saltzman W.M. Novel delivery strategies for glioblastoma. *Cancer J.* 2012; 18 (1): 89–99.
102. Chekhonin V.P., Baklaushev V.P., Yusubaliev G.M., Belorussova A.E., Gulyaev M.V., Tsitrin E.B. et al. Targeted delivery of liposomal nanocontainers to the peritumoral zone of glioma by means of monoclonal antibodies against GFAP and the extracellular loop of Cx43. *Nanomedicine*. 2012; 8 (1): 83–70.
103. Chekhonin V.P., Baklaushev V.P., Yusubaliev G.M., Gurina O.I., Dmitrieva T.B. A targeted transport of 125I-labeled monoclonal antibodies to target proteins in experimental glioma focus. *Doklady Biochem. i Biophys.* 2008; 418 (5): 1–4.
104. Chekhonin V.P., Baklaushev V.P., Yusubaliev G.M., Gurina O.I. Targeted Transport of 125I-Labeled Antibody to GFAP and AMVB1 in an Experimental Rat Model of C6 Glioma. *J. Neur. Pharmacol.* 2009; 4 (1): 28–34.
105. Chekhonin V.P., Dmitrieva T.B., Zhirkov U.A., Kabanov A.V., Gendel'man Kh. E. Nanosystems and targeted transport of medicinal preparations to the brain. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* 2009; 2: 32–40.
106. Lebedev S.V., Petrov S.V., Volkov A.I., Chekhonin V.P. The translocation of macromolecules via the hematoencephalic barrier. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* 2007; 6: 37–49.
107. Argaw A.T., Asp L., Zhang J., Navrazhina K., Pham T., Mariani J.N. et al. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J. Clin. Invest.* 2012; 122 (7): 2454–2468.
108. Dejana E., Tournier-Lasserre E., Weinstein B.M. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev. Cell.* 2009; 16: 09–221.
109. Ogunshola O.O., Stewart W.B., Mihalcik V., Solli T., Madri J.A., Ment L.R. Neuronal VEGF expression correlates with angiogenesis in postnatal developing rat brain. *Brain. Res.* 2000; 119 (1): 139–153.
110. Srikanth M., Kessler J.A. Nanotechnology-novel therapeutics for CNS disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 2012; 8 (6): 307–318.
111. Duggan S.T., Keating G.M. Pegylated liposomal doxorubicin: a review of its use in metastatic breast cancer, ovarian cancer, multiple myeloma and AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Drugs*. 2011; 71 (18): 2531–2558.
112. Chang H.I., Yeh M.K. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *Int. J. Nanomed.* 2012; 7: 49–60.
113. Lingappa M., Song H., Thompson S., Bruchertseifer F., Morgenstern A., Sgouros G. Immunoliposomal delivery of 213Bi for alpha-emitter targeting of metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 2010; 70 (17): 6815–6823.
114. Feng B., Tomizawa K., Michiue H., Han X.J., Miyatake S., Matsui H. Development of a bifunctional immunoliposome system for combined drug delivery and imaging *in vivo*. *Biomaterials*. 2010; 31 (14): 4139–4145.
115. Abakumov M.A., Shein S.A., Vishvasrao H., Nukolova N.V., Sokol'ski-Papkov M., Sandalova T.O. et al. Visualization of experimental glioma C6 by MRI with magnetic nanoparticles conjugated with monoclonal antibodies to vascular endothelial growth factor. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012; 154 (8): 242–246.
116. Wicki A., Rochlitz C., Orleth A., Ritschard R., Albrecht I., Herrmann R. et al. Targeting tumor-associated endothelial cells: anti-VEGFR2 immunoliposomes mediate tumor vessel disruption and inhibit tumor growth. *Clin. Cancer Res.* 2012; 18 (2): 454–464.
117. Ebos J.M., Bocci G., Man S., Thorpe P.E., Hicklin D.J., Zhou D. et al. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol. Cancer Res.* 2004; 2 (6): 315–326.
118. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144 (5): 646–674.
119. Erber R., Thurnher A., Katsen A.D., Groth G., Kerger H., Hammes H.P. et al. Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J.* 2004; 18 (2): 338–340.
120. Hiratsuka S., Duda D.G., Huang Y., Goel S., Sugiyama T., Nagasawa T. et al. C-X-C receptor type 4 promotes metastasis by activating p38 mitogen-activated protein kinase in myeloid differentiation antigen (Gr-1)-positive cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011; 108 (1): 302–307.
121. Rapisarda A., Hollingshead M., Uranchimeg B. et al. Increased anti-tumor activity of bevacizumab in combination with hypoxia inducible factor-1 inhibition. *Mol. Cancer Ther.* 2009; 8 (7): 1867–1877.
122. Chekhonin V.P., Shein S.A., Korchagina A.A., Gurina O.I. et al. VEGF in tumor progression and targeted therapy. *Curr. Cancer Drug. Targets*. 2013; 13 (4): 423–443.

FOR CORRESPONDENCE

Chekhonin Vladimir Pavlovich, PhD, professor, academician of RAMS, Head of the Department of Fundamental and applied neurobiology of FSBI “V.P. Serbskii SSC of social and forensic psychiatry”, Head of the Department of Medical nanobiotechnologies of N.I. Pirogov RRMU.

Address: 23, Kropotkinskii per., Moscow, RF, 119034, **tel.:** +7 (495) 695-02-62; **e-mail:** chekhoninnew@yandex.ru

Gurina Olga Ivanovna, PhD, Head of the Laboratory of Neurochemistry of FSBI “V.P. Serbskii SSC of social and forensic psychiatry”.

Address: 23, Kropotkinskii per., Moscow, RF, 119034, **tel.:** +7 (495) 695-02-62; **e-mail:** olga672@yandex.ru

Korchagina Anna Aleksandrovna, postgraduate of the Department of Medical nanobiotechnologies of N.I. Pirogov RRMU.

Address: 1, Ostrovityanov Street, Moscow, RF, 117997, **tel.:** +7 (495) 434-13-01; **e-mail:** avilis1@yandex.ru

Shein Sergei Aleksandrovich, MD, research scientist of the Laboratory of Neurochemistry of FSBI “V.P. Serbskii SSC of social and forensic psychiatry”.

Address: 23, Kropotkinskii per., Moscow, RF, 119034, **tel.:** +7 (495) 695-02-62; **e-mail:** atomos@rambler.ru