

В.П. Чехонин^{1, 2}, С.А. Шейн², А.А. Корчагина², О.И. Гурина¹

¹ ФГУ «Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им. В.П. Сербского» Минздравсоцразвития России, Москва

² ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздравсоцразвития России, Москва

Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза

Прогрессия солидных опухолей во многом зависит от степени васкуляризации и ангиогенеза малигнизированной ткани. Из целого спектра проангиогенных факторов наиболее серьезное значение имеет фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). Подавление функций VEGF приводит к регрессии неопластических сосудов и ограничению роста опухоли. Многообещающие результаты продемонстрировали клинические испытания комплексной антиангиогенной и химиотерапии различных неопластических образований. В настоящее время препарат бевацизумаб вошел в широкую клиническую практику при терапии рака молочной железы, колоректального рака и глиом III–IV степени злокачественности. К сожалению, в большинстве случаев антиангиогенная терапия не приводит к полному выздоровлению, а лишь замедляет развитие опухоли. Механизмы резистентности включают потенцирование альтернативных проангиогенных сигнальных путей и активацию инвазивной популяции опухолевых клеток.

Ключевые слова: бевацизумаб, ангиогенез, VEGF, антиангиогенная терапия, глиома.

Введение

Несмотря на то, что химиотерапия по-прежнему остается наиболее действенным инструментом в лечении опухолей, главными ее недостатками остаются высокая неспецифическая цитотоксичность, ограничивающая вводимую дозу, и развитие множественной лекарственной устойчивости MDR (Multidrug resistance) опухолевых клеток.

J. Folkman и соавт. [1] предположили, что рост и метастатическое распространение опухоли могут зависеть от степени развития микрососудов в малигнизированной ткани, а блокирование ангиогенеза будет эффективным средством ограничения роста солидных опухолей. В настоящее время этот стратегический подход стал основополагающим в терапии некоторых видов рака. Из мно-

жества проангиогенных факторов, участвующих в физиологическом и патологическом ангиогенезе, наиболее важным эффектором является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF, Vascular endothelial growth factor) A [2, 3]. В ряде случаев показано, что повышенная экспрессия VEGF коррелирует с неблагоприятным прогнозом и высокой вероятностью рецидивов. Преимущество такого подхода заключается в том, что анти-VEGF-терапия подавляет активацию задействованных в ангиогенезе рецепторов, следовательно, и трансдукцию сигнала в генетически стабильных эндотелиальных клетках. Клинические исследования продемонстрировали обнадеживающие результаты комбинированной антиангиогенной и химиотерапии, или радиотерапии; развитие этого направления может открыть новые перспективы повышения эффективности терапии опухолей [4–11]. В настоящее время

V.P. Chekhonin^{1, 2}, S.A. Shein², A.A. Korchagina², O.I. Gurina¹

¹ Federal State Institution «Serbsky State scientific centre of social and forensic psychiatry» Ministry of Healthcare and Social development, Moscow

² State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Pirogov Russian National scientific medical university» Ministry of Healthcare and Social Development of Russia, Moscow

VEGF in neoplastic angiogenesis

Solid tumor progression largely depends on vascularization and angiogenesis in the malignant tissue. The most prominent among all proangiogenic factors is vascular endothelium growth factor (VEGF). VEGF suppression leads to retrogression of neoplastic vessels and tumor growth restriction. Clinical trials of complex antiangiogenic and chemical therapy of different neoplastic tumors have shown promising results. Nowadays bevacizumab is widely used in breast cancer, colorectal cancer and II–IV stage of malignancy gliomas treatment. Unfortunately, in the majority of cases antiangiogenic treatment led not to full recovery, but only to tumor development restriction. Resistance mechanisms include potentiating of alternative proangiogenic signaling pathways and activation of malignant cell invasive population.

Key words: bevacizumab, angiogenesis, VEGF, antiangiogenic treatment, glioma.

разрабатываются и проходят клинические испытания высокоспецифичные препараты, направленные на селективное подавление ангиогенеза; из них наиболее широкое применение получил бевацизумаб [7].

Бевацизумаб — препарат гуманизированных моноклональных антител к VEGF, является антиангиогенным средством, одобренным FDA для использования в комплексной терапии при метастатическом раке ободочной и прямой кишок, прогрессирующем или метастатическом раке молочной железы наряду с цитостатической химиотерапией [7]. В начале 2009 г. бевацизумаб получил разрешение FDA на клиническое применение при рецидивирующей мультиформной глиобластоме (GBM, Glioblastoma multiforme).

Ежегодно в США диагностируется приблизительно 20 500 первичных злокачественных новообразований головного мозга, из них приблизительно две трети глиомы III–IV степени злокачественности — HGG (High grade gliomas). К сожалению, даже при подборе оптимальной терапии, состоящей из хирургической резекции, радио- и химиотерапии темозоломидом, мультиформная глиобластома остается смертельным диагнозом. Более 70% пациентов «уступают» болезни в течение 2 лет, и менее 10% живут более 5 лет после постановки диагноза [12]. Средняя выживаемость пациентов с более дифференцированными формами глиом составляет 2–5 лет, но и эти опухоли также инкурабельны. Большинство пациентов с рецидивом HGG умирают в течение 1 года, и только у 21% отсутствует прогрессия в первые 6 месяцев (PFS6, 6-month progression-free survival).

Глиомы высокой степени злокачественности являются высокоvascularизованными опухолями, поэтому особенно интересны в качестве мишеней антиангиогенной терапии [7]. Клинические исследования продемонстрировали, что бевацизумаб увеличивает показатель выживаемости без прогрессии опухоли [4–7, 13, 14], приостанавливает прогрессию глиобластомы и сдерживает перитуморальный отек [4–11], хотя увеличение общей выживаемости окончательно не доказано. Антиангиогенные методы лечения хорошо переносятся пациентами, однако возможность побочных эффектов существует. К тому же устойчивость малигнизированных клеток к антиангиогенной терапии неизбежно развивается. Механизмы резистентности затрагивают альтернативные пути проангиогенной сигнализации и миграцию опухолевых клеток в периваскулярном пространстве. Проблема эффективной терапии резистентных опухолей остается актуальной. Комбинация антиангиогенных агентов с радиационной терапией или цитостатической химиотерапией, а также методов антиинвазивной терапии, направленных на мигрирующие глиомные клетки, может стать новым этапом в терапии мультиформной глиобластомы.

VEGF и его роль в ангиогенезе

Как известно, сосуды состоят из трех основных типов клеток: эндотелиоциты — клетки, выстилающие трубчатую структуру кровеносного сосуда; гладкомышечные клетки, регулирующие внутрисосудистое давление; перicyты — сателлитные клетки, поддерживающие жизнеспособность эндотелиоцитов.

Процессы васкулогенеза и ангиогенеза особенно важны в период эмбрионального развития и роста организма, делеция только одного аллеля VEGF приводит

к гибели эмбриона [15]. На начальной стадии ангиогенеза происходит дифференцировка эндотелиоцитов из мезодермальных предшественников, затем развивается трубчатая сеть сосудов, этот процесс состоит из нескольких этапов: активации эндотелиальных клеток, деградации базальной мембраны, миграции клеток, пролиферации эндотелиоцитов и формирования просвета сосуда [16]. Терминация приводит к обращению этого процесса и стабилизации сосудистой сети: восстанавливается базальная мембрана, тормозится пролиферация, образуется комплекс клеточных контактов, формируются перicyты, поддерживающие рост сосудов. Во время роста и развития организма происходит образование новых сосудистых сетей за счет разрастания и ветвления сформированных сосудов [16]. Во взрослом организме активность ангиогенеза значительно снижена и связана преимущественно с процессами поддержания структуры сосудов, заживления ран и менструальным циклом [2, 17].

Регуляция ангиогенеза является динамическим процессом, который можно представить как сумму позитивных и негативных сигналов, включающих множество факторов микроокружения тканей. Некоторые из них, например VEGF, высокоспецифичны для эндотелиальных клеток, в то время как другие, например основной фактор роста фибробластов (bFGF) и металлопротеиназы матрикса, имеют широкий диапазон действия [16]. Регуляция ангиогенеза зависит не только от уровня экспрессии проангиогенных модуляторов, но и от уровня экспрессии ингибиторов этого процесса. Среди специфических ингибиторов, действующих на пролиферирующие эндотелиальные клетки, одними из самых мощных являются полипептиды — ангиостатин и эндостатин, образующиеся в первичных опухолевых очагах путем ограниченного протеолиза неактивных предшественников, что может сдерживать рост регионарных метастазов [18].

В результате взаимодействия VEGF с рецептором происходит его активация и запуск каскада вторичных мессенджеров, активирующих факторы транскрипции, что приводит к инициации генетической программы ангиогенеза, включающей синтез и секрецию дополнительных ангиогенных факторов по принципу положительной обратной связи [19].

Центральную роль в развитии как физиологического, так и патологического ангиогенеза играет фактор роста эндотелия сосудов, или эндотелиальный фактор роста сосудов VEGF (Vascular endothelial growth factor) [2, 3]. Генное семейство VEGF-млекопитающих включает 5 представителей VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и плацентарный фактор роста PlGF, которые относятся к супергенному семейству PDGF. Гомолог семейства VEGF обнаружен у Орф-вируса VEGF-E [20]. VEGF-A, B и PlGF — главные медиаторы ангиогенеза, VEGF-C и D регулируют процессы формирования лимфатических сосудов [21]. VEGF-A, также называемый VEGF, первоначально был охарактеризован как фактор сосудистой проницаемости, но впоследствии была открыта его митогенная активность по отношению к эндотелиоцитам. Ген молекулы VEGF-A расположен на 6-й хромосоме, его нуклеотидная последовательность имеет высокую гомологию с геном PDGF.

Альтернативный сплайсинг гена VEGF человека приводит к образованию 6 изоформ: 121, 145, 165, 183, 189 и 206 аминокислотных остатков (рис. 1) [22]. VEGF165 (45 кД) — гомодимерный гликопротеин, является доминантной изоформой, частично секретируемой, частично мембраносвязанной, преобладает в GBM [20]; VEGF189

и VEGF206 — основные гликопротеины, несут участок связывания с гепарином, закорены на экстраклеточной стороне мембраны через гепаран сульфат; секретируемая изоформа VEGF121 — кислая, не несет участка связывания с гепарином [16]. Матрикс-связанные изоформы могут быть переведены в растворимую форму гепариной или плазмином, который отщепляет диффузионный фрагмент VEGF110.

VEGF-A — мощный митоген для эндотелиальных клеток, но он не вызывает пролиферацию других типов клеток [23]. VEGF также запускает активацию каскадов протеиназ, участвующих в деградации экстраклеточного матрикса. Связываясь с эндотелиальными клетками, VEGF индуцирует экспрессию активаторов и ингибиторов плазминогена, урокиназных рецепторов, матриксных металлопротеиназ коллагеназы и желатиназы А, стимулирует фосфорилирование FAK (Focal adhesion kinase), в то же время снижается уровень тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ 1 и 2 [1]. Кроме того, активация матриксных металлопротеиназ приводит к протеолизу закоренных на мембране белков, таких как протеогликан гепаран сульфат, в результате чего происходит высвобождение мембраносвязанных изоформ проангиогенных факторов.

VEGF, подавляя апоптоз, стимулирует выживаемость эндотелиальных клеток, играет важную роль в мобилизации и миграции предшественников эндотелиоцитов из костного мозга в очаги ангиогенеза, а также увеличивает сосудистую проницаемость, ингибирует дифференциацию дендритных клеток, потенцирует транспорт гексоз в эндотелиоциты, активирует тканевые факторы и миграцию моноцитов.

VEGF является трофическим фактором для нервных клеток, недостаточный уровень которого приводит к нейродегенерации. Некоторые сигнальные пути являются общими в регуляции аксонального наведения и ангиогенеза. Проангиогенные факторы, особенно VEGF, играют важную роль в нейрогенезе, защите нейронов при травматических повреждениях, а также в патогенезе болезни Альцгеймера и моторных нейронов [24].

VEGF связывается с тирозинкиназными рецепторами VEGFR1 (Flt1) и VEGFR2 (KDR; мышиная форма, известна как Flk1) [2]. Активация этих рецепторов запускает фосфорилирование белков, участвующих в трансдукции сигнала [2]. Для всех членов VEGF-семейства характерна специализация связывания со своими рецепторами, VEGF-A взаимодействует с VEGFR1 и VEGFR2, VEGF-B и PlGF связываются и активируют только рецептор VEGFR1. VEGF-C и D связываются с третьим рецептором VEGFR3 (Flt4), запуская лимфоангиогенез, а также показывают некоторую активность с VEGFR2. Несмотря на то, что VEGFR1 взаимодействует с лигандом с наивысшей аффинностью, предполагают, что рецептор первого типа функционирует главным образом в качестве ловушки, связывая VEGF и тем самым ингибируя VEGF-опосредованную сигнализацию; таким образом регулируется взаимодействие VEGF с VEGFR2, который считается главным рецептором сигнального пути VEGF [2]. Однако функции VEGFR1 сложнее: показана позитивная регуляция ангиогенеза через активацию протеиназ и экспрессию факторов роста [25].

Связывание VEGF с рецептором VEGFR2 приводит к димеризации и аутофосфорилированию каталитического домена рецептора, запускающего сигнальный путь PI3K/v-akt (Phosphoinositide 3-kinase/murine thymoma viral oncogene homolog, также известный как Akt или

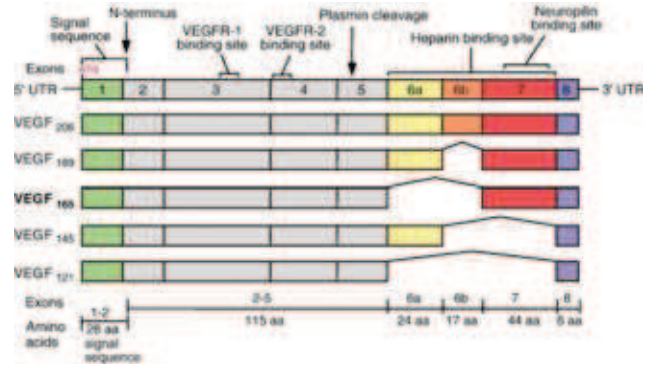


Рис. 1. Экзонная структура сплайс-вариантов VEGF-A человека [22]

serine/threonine protein kinase B, PKB), а также Raf и MAP2K, которые далее фосфорилируют MAPK (Erk) [2]. АКТ — главный внутриклеточный медиатор сигнального пути выживания, который защищает клетки от апоптоза. В результате запускается экспрессия антиапоптотических белков Bcl2, XIAP, Bcl-A1, сурвивина [26–30], активация циклинов и циклин-зависимых протеинкиназ Cdk (Cyclin dependent kinase), что приводит к выходу эндотелиоцитов из G₀-фазы и вступлению в клеточный цикл; также происходит активация интегринов, стимулирующих клеточную адгезию, миграцию и рост эндотелиальных клеток [21]. Высокий уровень активации АКТ обнаружен в различных опухолях, включая карциномы, GBM и гемобласты [31–33]. В ряде исследований степень фосфорилирования АКТ коррелировала с неблагоприятным прогнозом.

Фосфорилирование и дефосфорилирование являются основными механизмами внутриклеточной передачи сигнала. При фосфорилировании изменяется конформация белков, что приводит к активации ферментов и регуляторных молекул, которые также могут проявлять киназную активность. Таким образом, передача сигнала заключается в волновой активации белков. Кроме того, фосфорилирование приводит к формированию стыковочных участков на белках. Механизм передачи сигнала включает не только активацию ферментов, но и временное формирование внутриклеточных передатчиков.

Связывание VEGF с экстраклеточным иммуноглобулинподобным доменом VEGFR2 приводит к изменению конформации рецептора и активации сайтов димеризации. Передача молекулярного сигнала от лиганда происходит за счет димеризации рецепторов и активации каталитического тирозинкиназного домена, что приводит к ауто- или перекрестному фосфорилированию [22]. Фосфорилирование тирозиновых остатков формирует участки связывания с SH2 (Src-homology) и SH3 доменами цитоплазматических адаптерных белков.

VEGF-A — специфический митоген эндотелиальных клеток [23], индукция пролиферации осуществляется через активацию Erk (extracellular signal-regulated kinases)-пути, также называемого MAPK. MAPK-путь активен в период роста и развития тканей, а также в период репаративных процессов, инактивируется в дифференцированных неделящихся клетках. Однако, в отличие от других тирозинкиназных рецепторов, активация Erk-пути, опосредованная VEGFR2-рецептором по классическому Grb2-Sos-Ras механизму, не обнаружена, и точная роль Ras-белка в VEGFR2-сигнализации не известна, хотя

VEGFR2 содержит последовательность pY-D-N-T, которая потенциально является сайтом связывания с SH2 — доменом Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) [22]. В другой работе обнаружено независимое от сайта тирозин-1175 взаимодействие Grb2 и VEGFR2 [34]. Возможно, что эндотелиальные клетки используют нетипичные медиаторы рецептора VEGFR2 и Grb2-Sos-Ras-механизма, и передача сигнала осуществляется через еще не идентифицированный адаптерный белок. Есть данные, что VEGFR2 способен активировать Ras-белок через протеин киназу C (PKC) и сфингозин киназу SphK [35].

VEGFR2-опосредованная трансдукция сигнала и активация Erk-киназ осуществляется через PKC-зависимый механизм (рис. 2), включающий активацию PLC- γ [36]. Аутофосфорилирование тирозина-1175 на C-терминальном конце VEGFR2 приводит к связыванию и фосфорилированию молекулы PLC- γ , что приводит к увеличению ее каталитической активности. В результате PLC- γ гидролизует мембранный фосфолипид фосфатидинозитол 4,5-бифосфат (PIP₂) с образованием диацилглицерола (DAG) и инозитол 1, 4, 5-трифосфата (IP₃). Генерация IP₃ приводит к осцилляции кальциевых волн в цитоплазме, а DAG и Ca²⁺ являются физиологическими регуляторами PKC, которая в свою очередь активирует Raf-белок.

Далее Raf активирует MAP2K (Mitogen-activated protein kinase), также известную как MEK (Mitogen-activated protein kinase/Extracellular signal-regulated kinase), содержащую каталитические домены для фосфорилирования остатков тирозина, треонина и серина. MAP2K фосфорилирует остатки тирозин-185 и треонин-183 в молекулах Erk и MAPK-семейства [2], после чего MAP2K инактивируется фосфатазой. Также MAP2K может активировать киназы, регулирующие функци-

онирование циклинов и Cdk (Cyclin dependent kinase). Активированные MAPK фосфорилирует множество ядерных и цитоплазматических белков, среди которых факторы транскрипции, регуляторные белки цитоскелета и даже компоненты сигнального пути SOS, Raf1, RPTK-рецепторы, связанные положительной обратной связью с последующими компонентами трансдукции сигнала. Таким образом, за счет регуляции активности генов медиаторы ангиогенеза запускают генетические программы пролиферации, миграции и выживания эндотелиальных клеток [21].

В модуляции активности VEGF могут принимать участие и нейропилины. Нейропилины — трансмембранные гликопротеины, которые являются корецепторами коллаксин/семафоринового семейства [37], молекулы которого участвуют в аксональном наведении конуса роста и развитии нервной системы. Нейропилины активны в форме димеров, причем различные комбинации имеют разную аффинность к лигандам. Нейропилин-2 связывается с VEGFR1, в то время как нейропилин-1 взаимодействует с VEGF165 и увеличивает его аффинность к VEGFR2 приблизительно на порядок [37], потенцируя таким образом VEGF-сигнализацию и проангиогенную активность [1].

Ряд внешних стимулов приводит к повышению уровня экспрессии VEGF, например эстроген, окись азота (NO), разнообразные ростовые факторы: FGF2, FGF4, PDGF, TNF- α , EGF, TGF- β , KGF, IL6, IL-1 β и IGF1 [2, 37]. Генетические перестройки, такие как нарушение функционирования генов супрессии опухолей, например p53 и pVHL (protein von Hippel-Lindau), активация онкогенов Ras, v-src и HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2), приводящих к злокачественной трансформации клеток, также затрагивают процессы регуляции экспрессии VEGF [38].

Экспрессия VEGF в значительной степени зависит от концентрации кислорода в тканях. Транскрипция гена VEGF активируется в условиях гипоксии фактором HIF1 α (Hypoxia-inducible factor 1 α), который стабилизируется и димеризуется с HIF2 α , что приводит к активации промотора VEGF-A [39, 40]. Гипоксия — одна из главных причин активации VEGF-сигнализации в тканях. Условия гипоксии характерны для солидных опухолей с высокой плотностью клеток [21]. При исследовании уровня мРНК VEGF в различных участках мультиформной глиобластомы GBM наивысшая концентрация была обнаружена в регионах некроза, в которых гипоксия была наиболее выражена [40]. В условиях гипоксии также возрастает экспрессия обоих рецепторов VEGFR1 и VEGFR2 эндотелиальными клетками, увеличение презентации рецепторов на мембране приводит к связыванию большего количества лиганда, что, в свою очередь, усиливает сигнал [16]. TGF- β (Transforming growth factor β) усиливает экспрессию VEGF, однако снижает уровень мРНК VEGFR, а для TNF- α известны сведения как о позитивной, так и о негативной регуляции VEGFR2 [2].

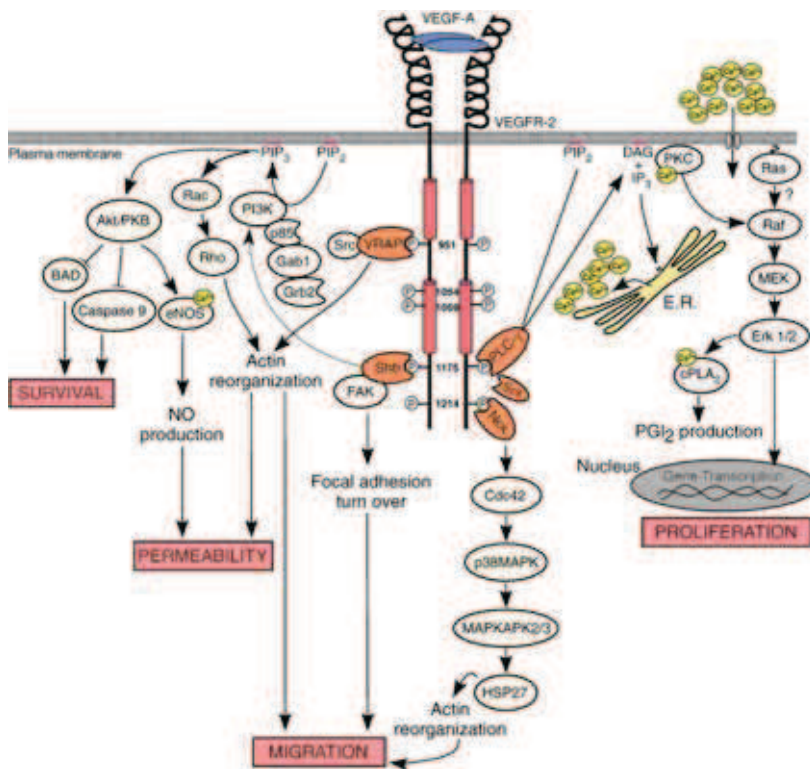


Рис. 2. Активация VEGF-VEGFR-2-опосредованных сигнальных каскадов [22]

Роль VEGF в прогрессии опухолей

Простая диффузия питательных веществ и кислорода происходит в пределах не более 1–2 мм опухолевой ткани [16], для дальнейшего роста необходимо кровоснабжение и развитие сосудистой сети. Опухоли могут находиться в скрытом состоянии годами, до того момента, пока не произойдет трансформация клеток в ангиогенный фенотип [16]. Этот феномен известен как ангиогенное переключение. В его основе лежит нарушение баланса между ингибиторами и активаторами ангиогенеза. Многие генетические отклонения, лежащие в основе малигнизации, такие как активация онкогенов и нарушения функционирования генов супрессии неконтролируемого роста, могут запустить ангиогенное переключение [38]. Неопластические сосуды не только обеспечивают кровоснабжение первичной опухоли, но также повышают вероятность метастатического распространения раковых клеток по кровеносной системе.

Если трансформация произошла, то 100–300 опухолевых клеток способны запустить ангиогенез. Таким образом, опухоли, накопившие генетические абберации, лежащие в основе ангиогенного переключения, обладают потенциалом к быстрому росту на ранних стадиях.

Обширные экспериментальные данные подтверждают, что рост солидных опухолей, включая HGG, значительно зависит от уровня кровоснабжения [1]. Высокий уровень васкуляризации является одним из патологических признаков GBM [7]. Связь между уровнем ангиогенеза в опухоли и ее метастазированием подтверждена корреляцией между течением заболевания и плотностью микрососудов первичной опухоли. Хотя связь не была абсолютной, плотность микрососудов может использоваться в качестве маркера неблагоприятного прогноза [41].

Вместе с VEGF малигнизированные клетки GBM экспрессируют и другие проангиогенные факторы, такие как основной фактор роста фибробластов bFGF, ангиопоэтин, тромбоцитарный фактор роста PDGF, интерлейкин-8, гипоксия-индуцированный фактор 1 α (HIF1 α) [42] и фактор роста гепатоцитов HGF (Hepatocyte growth factor) [43].

Неопластические сосуды структурно и функционально отличаются от нормальных: для них характерна высокая проницаемость, хаотичный характер ветвления, многочисленные петли, переплетения, тупиковые ветви, отсутствие структурированности сосудистой сети и малочисленность перичитов [16].

Экспрессия VEGF повышает проницаемость сосудов, что приводит к увеличению интерстициального и внутриопухолевого давления, способствуя проникновению опухолевых клеток в сосудистое русло [44]; кроме того, нарушает поступление в опухолевые ткани терапевтических агентов [45, 46]. Хаотическое расположение опухолевых сосудов приводит к неравномерному поступлению кислорода в окружающие ткани, в результате образуются локальные очаги гипоксии, устойчивые к лучевой терапии.

Считается, что в солидных опухолях преобладают процессы ангиогенеза, однако опухоли способны развиваться, поглощая зрелые сосуды, которые затем разрушаются, в результате происходит регрессия опухоли и ревертирование к гипоксия-индуцированному ангиогенезу [47]. К тому же, в процессе ангиогенеза из кровотока мобилизуются предшественники эндотелиоцитов.

Проангиогенные факторы, в частности VEGF, экспрессируются преимущественно опухолевыми клетками

и в меньшей степени клетками окружающих тканей, мигрирующими макрофагами, фибробластами и эндотелиальными клетками [21]. Неопластический ангиогенез преимущественно опосредован через VEGF-сигнализацию и включает взаимодействие опухолевых и эндотелиальных клеток. В исследованиях разных типов злокачественных новообразований выявлена повышенная экспрессия VEGF: гемобласты, рак толстой и прямой кишки, рак печени, легкого, щитовидной железы, желудочно-кишечного тракта, аденокарцинома молочной железы, почек, мочевого пузыря, карцинома яичника и шейки матки, ангиосаркома, опухоли гоноцитов, мультиформная глиобластома. В работах по исследованию рака молочной железы, яичников и колоректального рака после удаления опухоли у пациентов с высоким уровнем VEGF состояние ухудшалось, и повышался риск повторных рецидивов [48].

Повышенная экспрессия VEGF опухолевыми клетками может играть важную роль в патогенезе злокачественных новообразований, поскольку кровоснабжение является одним из определяющих факторов роста опухоли. VEGF запускает неопластический ангиогенез, в результате возрастает плотность микрососудов, и малигнизированная ткань получает больше питательных веществ. Секрция VEGF опухолевыми клетками приводит к эскалации синтеза проангиогенных факторов; поскольку VEGF запускает ангиогенез, новые сосуды начинают снабжать малигнизированную ткань кислородом и питательными веществами, опухоль растет и вырабатывает большее количество VEGF. Кроме того, VEGF по принципу положительной обратной связи увеличивает уровень экспрессии рецептора VEGFR2 эндотелиоцитами опухолевых микрососудов [49], что стимулирует клеточный рост и пролиферацию эндотелиальных клеток.

Продемонстрировано, что VEGF играет важную роль в поддержке жизнеспособности вновь образованных неопластических сосудов, особенно при дефиците перичитов [50], тогда как низкий уровень экспрессии VEGF приводит к апоптозу эндотелиальных клеток [51]. Перичиты стабилизируют стенки сосудов, а также влияют на проницаемость сосудов, пролиферацию, жизнеспособность, миграцию и созревание эндотелиальных клеток. Снижение их числа повышает чувствительность опухолевых сосудов к ингибиторам VEGF [50]. В присутствии VEGF неопластическая сосудистая сеть продолжает существовать за счет усиления экспрессии антиапоптотических белков Bcl2, XIAP, Bcl-A1, сурвивина [26–30]. Таким образом, в течение всего времени развития опухоли интенсивность образования новых сосудов зависит от уровня синтеза VEGF [30].

Многие опухоли не только VEGF-позитивны, но и экспрессируют VEGFR-рецепторы, в этом случае VEGF действует непосредственно на опухолевые клетки как аутокринный фактор. VEGF запускает пролиферацию и повышает выживаемость клеток через увеличение экспрессии антиапоптотических факторов Bcl2 [52] и сурвивина [53], VEGFR-позитивных опухолевых линий *in vitro*. Таким образом, ингибирование медиаторных функций VEGF может оказывать прямой противоопухолевый эффект.

Положительная корреляция между уровнем экспрессии VEGF в первичных опухолях и вероятностью рецидивов показана в исследованиях различных видов злокачественных новообразований: острой миеломной лейкемии, раке молочной железы, толстой кишки, гепа-

токлеточной карциноме, немелкоклеточном раке легкого и яичников [19]. Эти данные подтверждают, что VEGF является необходимым условием развития и прогрессии опухолей. Уровень экспрессии VEGF среди разных типов глиом коррелирует со степенью злокачественности. Уровень VEGF в низкодифференцированных формах в 10 раз превышает таковой в более дифференцированных [43]. Высокий уровень VEGF выявлен в злокачественных эффузиях, возможно, VEGF-опосредованное увеличение проницаемости сосудов может способствовать их развитию [54]. Повышение экспрессии VEGF увеличивает резистентность опухоли к химио- или гормональной терапии [55]. Следовательно, уровень VEGF может служить важным и достоверным маркером как в предсказании эффективности химио- и радиотерапии, так и в оценке риска повторных рецидивов при различных новообразованиях [48, 54].

VEGF-опосредованное повышение проницаемости микрососудов позволяет жидкости и плазменным компонентам накапливаться в межклеточном пространстве [56], в результате возрастает интерстициальное давление, приводящее к отеку. Это особенно неблагоприятно сказывается на пациентах с церебральными опухолями, поскольку высокое внутричерепное давление может привести к осложнениям.

28

Ранее считалось, что развитие лейкемии и других гемобластозов не зависит от ангиогенеза, и что в этих случаях раковые клетки не стимулируют ангиогенез. Однако было обнаружено, что интенсивность ангиогенеза в костном мозге связана с прогрессией множественной миеломы, и в биоптатах костного мозга выявлены признаки усиленного ангиогенеза [57, 58]. На животных моделях показано, что эндостатин и ангиостатин препятствуют течению лейкемии. При терапии множественной миеломы талидомидом у пациентов зафиксировано снижение уровней VEGF и bFGF в плазме [59]. Интересно, что изменение уровней этих факторов коррелировало с эффективностью терапии [57].

VEGF является медиатором ингибирования процесса дифференциации дендритных клеток, что может быть одной из причин редукции иммунитета онкологических больных. Дендритные клетки онкологических больных обладают сниженной антигенпредставляющей способностью вследствие снижения экспрессии CD80 и CD86 [60, 61]. VEGF препятствует дифференцировке гемопоэтических предшественников в дендритные клетки, что может быть одним из факторов иммуносупрессии. Возможно, подавление воздействия VEGF на созревание дендритных клеток может привести к активации противоопухолевого иммунитета.

Дендритные клетки являются мощными стимуляторами первичного иммунного ответа и обладают способностью презентировать антигены Т-клеткам, стимулируя их дифференцировку в антигенспецифические цитотоксические лимфоциты. Известно, что в недифференцированном состоянии дендритные клетки присутствуют в небольшом количестве во всех тканях организма, и при наличии сигналов воспаления они быстро поглощают чужеродные антигены и дифференцируются, затем зрелые клетки мигрируют во вторичные лимфоидные органы и там инициируют иммунный ответ [62]. *In vitro* показано, что IL6 и макрофагальный колониестимулирующий фактор M-CSF, секретлируемые опухолевыми клетками, подавляют экспрессию рецептора гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора GM-CSF, блокируя диффе-

ренцировку CD34+-предшественников в дендритные клетки [63].

Основные механизмы антиангиогенной терапии

Существующие антиангиогенные препараты можно разделить на несколько категорий:

1. Ингибиторы факторов роста.
2. Ингибиторы рецепторов.
3. Ингибиторы пролиферации эндотелиальных клеток.
4. Ингибиторы матриксных металлопротеиназ.
5. Препараты, снижающие выживаемость эндотелиоцитов и клеток-предшественников.

Мультифункциональность VEGF и его стратегическая роль в развитии неопластического ангиогенеза сделали эту молекулу главной мишенью антиангиогенной терапии. Ингибиторы VEGF предотвращают активацию рецепторов и дальнейшую трансдукцию проангиогенного сигнала, подавляя пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, препятствуя формированию сосудистой сети. Кроме того, антиангиогенная терапия приводит к апоптотической гибели эндотелиоцитов и регрессии патологических сосудов [64], в результате сокращается число и плотность микрососудов в опухоли [45, 65]. Анти-VEGF-антитела замедляют рост опухоли у мышей [66].

Ингибиторы VEGF способствуют ремоделированию структурных и функциональных нарушений опухолевой сосудистой сети [45, 46]: сосуды становятся более однородными по размеру, упорядоченными, увеличивается число перicyтов, снижается проницаемость микрососудов и, как следствие, снижается внутриопухолевое давление [67]. Эффект анти-VEGF-терапии развивается менее чем за 24 часа: диаметр сосудов уменьшается, объем проходящей через опухоль крови снижается, сокращается плотность капиллярной сети [68]. Однако преждевременная отмена антиангиогенной терапии приводит к быстрому возобновлению роста сосудов и реваскуляризации. Вероятно, причина быстрой реваскуляризации связана с присутствием оставшихся эндотелиальных клеток, значительно ускоряющих этот процесс.

Для традиционной терапии одной из главных проблем является низкая проникающая способность лекарственных препаратов в солидные опухоли, возникающая вследствие патологического строения сосудистой сети, а именно хаотического ветвления и образования слепых сосудов [45], а также высокого интерстициального давления, причиной которого является увеличение проницаемости сосудов. В случае антиангиогенных препаратов, направленных на эндотелиоциты или медиаторы ангиогенеза, проблему транспорта лекарств удастся в той или иной мере разрешить. Кроме того, радио- и химиотерапия приводят к локальной гипоксии, что индуцирует синтез VEGF [16], а повышенная экспрессия VEGF защищает опухолевые клетки от апоптоза, снижая эффективность традиционной терапии [52]. Можно было бы предположить, что антиангиогенная терапия снизит эффективность химио- и радиотерапии, поскольку приведет к ретракции, снижению проницаемости и плотности микрососудов в опухоли. Однако нормализация сосудистой сети увеличивает проникновение противоопухолевых препаратов внутрь злокачественной ткани и увеличивает эффективность цитотоксической терапии

[65, 69]. Синтетический аналог фумагиллина TNP470 увеличивает уровень циклофосамид-индуцированного киллинга опухолевых клеток [70]. Ингибитор VEGFR сунитиниб на время улучшает проникновение темозоломида в опухоль [71]. Результаты этой работы свидетельствуют о периоде временной нормализации сосудов, в течение которой применение цитостатических препаратов или радиоактивных изотопов будет наиболее эффективным [14].

Монотерапия анти-VEGF-антителами подавляет ангиогенез, в то время как комбинированное лечение, состоящее из анти-VEGF-антител и доксорубина, приводит к выраженной регрессии опухоли по сравнению с введением каждого препарата в отдельности [69]. Применение же одного доксорубина замедляет рост опухоли, но не затрагивает ангиогенез.

Антиангиогенная терапия может быть селективно нацелена на опухолевые стволовые клетки. Это небольшая самовозобновляющаяся популяция опухолевых клеток, как предполагают, лежит в основе устойчивости опухолей к радио- и химиотерапии, в том числе и глиом. Глиомные стволовые клетки — источник проангиогенных молекул, таких как VEGF [72]. Эти клетки существуют в так называемой сосудистой нише, микросреде периваскулярного пространства, созданной неопластическими эндотелиоцитами [73]. Возможно, опухолевые стволовые клетки будут чувствительны к антиангиогенной терапии и другим подходам, направленным на дезорганизацию неопластической сосудистой сети.

Молекула VEGF передает сигнал эндотелиальным клеткам, поэтому развитие резистентности к анти-VEGF-терапии происходит в меньшей степени. Однако есть данные, подтверждающие снижение эффективности антиангиогенной терапии за счет генетических мутаций, снижающих чувствительность малигнизированных клеток к гипоксии [74, 75]. Интересно, что чувствительность трансплантированной опухоли, несущей два дефектных аллеля Tr53(-/-), к антиангиогенной терапии была меньше, чем опухоли с нормальным генотипом Tr53(+/-) [75]. Белок p53 является транскрипционным фактором, его основная функция — супрессия пролиферации клеток. В норме p53 нестабилен и быстро деградирует, однако при определенных условиях, например при повреждении ДНК, стабилизируется и присоединяется к регуляторным последовательностям ДНК. p53 регулирует экспрессию bax и p21, в контроле клеточного цикла принимает участие множество генов, в промоторных зонах которых находится p53-связывающий домен.

Клинические аспекты анти-VEGF-терапии

Антиангиогенная терапия бевацизумабом стала стандартным подходом в лечении рака толстой кишки, легкого и молочной железы. Показано, что бевацизумаб подавляет активацию рецепторов VEGFR и стимулирует апоптоз опухолевых клеток: медиана снижения уровня фосфорилированного рецептора VEGFR2 в опухоли составила 66,7%, медиана увеличения уровня апоптоза опухолевых клеток — 128,8% [76].

На I стадии клинических исследований 29 пациентов с рецидивами HGG перенесли комплексную терапию бевацизумабом и иринотеканом, активный метаболит которого — SN38 — ингибирует топоизомеразу I. Девятнадцать (66%) пациентов достигли частичного

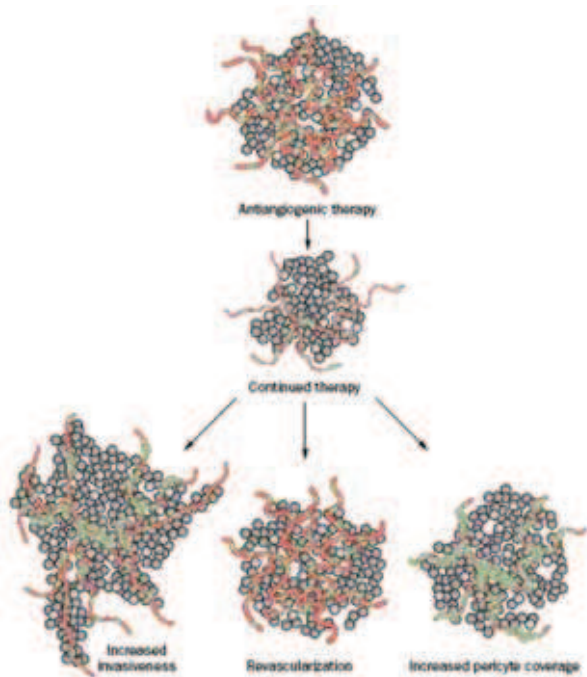
ответа [7], то есть 50% или большее уменьшение опухоли по данным МРТ. Важно, что бевацизумаб был относительно безопасен, лишь у 1 пациента терапия сопровождалась развитием внутримозгового кровоизлияния [7]. В другой работе ответ составил 50%, и у 1 пациента наблюдался позитивный эффект уже после 18 дней терапии [6]. В последующих ретроспективных исследованиях, включающих большую выборку пациентов, позитивный эффект составил от 25 до 74%, 6-месячная выживаемость без прогрессии PFS6 составила от 32 до 64% [4, 5, 8–11]. Результаты клинических испытаний свидетельствуют о значительной эффективности комбинированной антиангиогенной и химиотерапии и превосходят 21% показатель PFS6 для темозоломида. К тому же, бевацизумаб позволил снизить терапевтическую дозу кортикостероидов у большинства пациентов (corticosteroid-sparing effect) [4–11]. Несмотря на риск интракраниальных кровоизлияний при антиангиогенной терапии, их вероятность весьма мала, и подобное осложнение у пациентов, получающих бевацизумаб, немногим более вероятно, чем у больных HGG вообще [7]. Также в список побочных эффектов антиангиогенной терапии входят гипертензия, протеинурия, усталость, тромбоэмболия и длительное заживление ран.

II стадия клинических исследований бевацизумаба и иринотекана включала 35 пациентов с рецидивами GBM и 33 пациента с рецидивами анапластической глиомы. Позитивный эффект наблюдался приблизительно у 60% пациентов, показатель PFS6 составил 43% для пациентов с GBM и 59% для пациентов с анапластической глиомой [13], двухлетняя выживаемость для пациентов с GBM составила 15%.

Комбинированное лечение бевацизумабом и химиотерапевтическими препаратами пациентов с метастазирующим колоректальным раком приводило к значительному улучшению и наивысшей выживаемости по сравнению с применением только химиотерапии [77].

Клинические испытания проходят и другие анти-VEGF-препараты. Один из них афлиберцепт — растворимый VEGFR конъюгированный с константной областью иммуноглобулина. Аффинность афлиберцепта к VEGF-A по сравнению с бевацизумабом приблизительно на два порядка выше, к тому же афлиберцепт связывает VEGF-B и плацентарный фактор роста (PlGF), которые также участвуют в ангиогенезе. Предклинические исследования показали эффективность афлиберцепта на ранней и продвинутой стадиях прогрессии опухолей мозга [78].

В качестве антиангиогенных агентов широко изучаются низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназных рецепторов, вовлеченных в передачу проангиогенного сигнала [7]. Действие таких препаратов менее специфично, они активны в отношении не только VEGFR, но и в отношении ряда других тирозинкиназных рецепторов. Цедираниб AZD2171 является ингибитором рецепторов VEGFR. В клинических испытаниях с участием пациентов с рецидивами GBM позитивный эффект терапии AZD2171 наблюдался у 56%, а PFS6 — у 26%, при этом у всех пациентов доза кортикостероидов была снижена. Динамическое МРТ исследование выявило уменьшение просвета кровеносных сосудов и снижение их проницаемости. Типичные побочные эффекты ограничивались гипертонией, диареей и усталостью. Антиангиогенная терапия цедиранибом привела к повышению уровня проангиогенных факторов bFGF, SDF1 α , а также растворимой формы VEGFR2 в сыворотке.



30 **Рис. 3.** Предполагаемые механизмы резистентности опухолей к антиангиогенной терапии бевацизумабом [7]

В то же время уровень PIGF уменьшился, а концентрация циркулирующих в кровотоке эндотелиальных клеток повысилась [14].

После одобрения бевацизумаба FDA этот препарат широко вошел в клиническую практику в США. Однако при диагнозе GBM лишь у 30% пациентов отсутствует прогрессия опухоли в течение 6 месяцев после лечения. Поэтому поиск маркеров для оценки эффективности антиангиогенной терапии остается крайне актуальной задачей. Уровень экспрессии VEGF коррелирует с параметрами опухолевой прогрессии и плотностью сосудов в злокачественных новообразованиях, в том числе в GBM [43, 79, 80], а кроме того, позволяет предсказать ответ опухоли на антиангиогенную и цитостатическую терапию, но не на выживаемость пациентов [48, 54].

Механизмы резистентности

Несмотря на преимущества антиангиогенного подхода в терапии злокачественных новообразований, добиться полного выздоровления зачастую не удается, развитие опухоли только приостанавливается. Подавление ангиогенеза приводит к инвазивному росту опухоли вдоль сформированных кровеносных сосудов (рис. 3) [42, 47, 81, 82]. Исследования на модели опухоли мозга мыши показали, что периваскулярный рост опухоли усиливается, если животным вводить ингибиторы VEGF [83]. Ряд клинических исследований согласуется с экспериментальными работами [5, 8, 84], и хотя этот феномен не был подтвержден морфологически, данные о прогрессии неврологических нарушений косвенно подтверждают активацию инвазивного периваскулярного роста опухоли в ответ на лечение бевацизумабом [5].

Данные о повышении уровней bFGF и SDF-1 α в сыворотке, а также количество циркулирующих эндо-

телиальных клеток во время терапии цединрибимом [14] указывают на ключевую роль альтернативных проангиогенных сигнальных путей в механизмах реваккуляризации неопластических сосудов (см. рис. 3). Возможно, комбинирование анти-VEGF и анти-VEGFR-препаратов, а также применение ингибиторов альтернативных проангиогенных путей значительно повысит эффективность терапии опухолей мозга. Однако есть данные, что антиангиогенная терапия может запускать локальную инвазию и метастазирование [83, 85].

Другой вероятный механизм резистентности предполагает потенцирование PDGF-сигналикации, что стабилизирует новообразованные сосуды, рекрутирует перicyты (см. рис. 3) и облегчает взаимодействие перicyтов с эндотелиоцитами. Преκлинические исследования показали, что ингибирование VEGFR и PDGFR повышает эффективность антиангиогенной терапии и подавляет развитие резистентности [86].

Миграция предшественников эндотелиальных клеток в опухолевый очаг и их образование в костном мозге, вероятно, вносит вклад в сопротивление опухоли [42]. Этот механизм восполнения клеток эндотелия частично зависит от HIF1 α -индуцированной (Hypoxia-inducible factor 1 α) стимуляции SDF1 α (Stromal cell-derived factor 1 α) [7]. Гипоксия приводит к увеличению уровня экспрессии HIF1 α и рецептора CXCR4 для SDF1 α [87]. Ингибирование рецептора CXCR4 макроциклической молекулой AMD3100 (plerixafor) на ксенотрансплантационной модели GBM приводило к уменьшению роста опухоли [88] и заметно снижало инвазию опухолевых клеток *in vitro* [87].

Опухолевые стволовые клетки и инвазия

Существует гипотеза, что антиангиогенная терапия может индуцировать пролиферацию и инвазию стволовых опухолевых клеток, что нередко приводит к формированию инвазивного фенотипа роста опухоли и поглощению кровеносных сосудов [21]. После получения первых результатов антиангиогенной терапии злокачественных глиом возникают вопросы о влиянии терапии на инвазивную популяцию опухолевых клеток. Существуют данные о присутствии недифференцированных предшественников нервных клеток в опухолях мозга [89, 90]. Были выделены и идентифицированы клетки GBM человека, обладающие потенциалом нейральных стволовых клеток, включая мультипотентность *ex vivo*, и способные образовывать GBM-подобные опухоли после интракраниальной ксенотрансплантации животным [91]. Изучение опухолевых стволовых клеток и их роли в патогенезе позволит более детально понять механизмы возникновения и развития злокачественных новообразований. Показано, что высокоинвазивные опухоли мозга GBM человека могут развиваться после трансплантации стволовых опухолевых клеток иммунодефицитным голым крысам [92]. Эти опухоли способны дезинтегрировать нормальные кровеносные сосуды и проявлять агрессивный инвазивный рост в отсутствие ангиогенеза, опухолевые клетки при этом экспрессируют некоторые маркеры нервных прогениторных клеток и мигрируют подобно нормальным нервным клеткам [92]. Последовательный пассаж ксенотрансплантантов через животных постепенно приводил к преобразованию опухоли в более агрессивный VEGF-опос-

редованный ангиогенез-зависимый фенотип, вместе с тем наблюдалось снижение уровня миграции опухолевых клеток [92].

Расхождение ангиогенез-независимого инвазивного роста, в котором принимают непосредственное участие опухолевые стволовые клетки, и ангиогенного развития опухоли может указывать на два механизма прогрессии GBM. Один заключается в экстенсивной инвазии опухолевых клеток с поглощением существующих сосудов, тогда как для другого характерны быстрая пролиферация малигнизированных клеток, интенсивный неоангиогенез и снижение инвазии [21, 92].

Заключение

VEGF-индуцированная сосудистая сеть обеспечивает рост опухоли и имеет ряд структурных и функциональных особенностей [44–46]. На моделях, используемых в доклинических исследованиях, показано, что применение бевацизумаба приводит к быстрой регрессии, нормализации и подавлению роста сосудистой сети опухоли. В результате рост опухоли приостанавливается или происходит ее обратное развитие; кроме того, снижается риск метастазирования [66, 67, 69]. Однако необходимо отметить, что после прекращения антиангиогенной терапии рост опухоли возобновляется, и активируются процессы реваскуляризации.

Преимуществом анти-VEGF-терапии являются эффективность на всех стадиях опухолевого процесса, меньшая вероятность развития резистентности, отсутствие проблемы доступности клеток-мишеней, ингибирование трансдукции сигнала к эндотелиальным клеткам, предупреждающий эффект метастазирования, отсутствие неспецифической цитотоксичности, повышение эффективности химио- и радиотерапии. Кроме того, комбинированная антиангиогенная и традиционная терапия позволяют обеспечить максимальную гибкость и вариативность в лечении, разработать индивидуальную программу для пациента.

GBM — наиболее васкуляризованные опухоли, в которых интенсивно протекают процессы неоангиогенеза, опосредованные через секрецию VEGF [21]. Преклинические и клинические исследования доказали, что анти-VEGF-препараты, в частности бевацизумаб,

достаточно эффективны в лечении злокачественных опухолей головного мозга [4–11], кишечника, молочной железы и легкого. Антиангиогенная терапия позволила существенно повысить эффективность лечения злокачественных новообразований, в частности низкодифференцированных глиом. Комбинированная терапия с бевацизумабом значительно повышала вероятность ответа на лечение (по данным МРТ) и показатель 6-месячной выживаемости без прогрессии опухоли PFS6 [4–11]. В большинстве случаев такой подход позволил уменьшить дозы кортикостероидов и, следовательно, снизить побочные эффекты на организм пациента. Сходные результаты получены в исследованиях препаратов, ингибирующих функциональную активность рецептора VEGFR [14]. К сожалению, для значительной части пациентов с низкодифференцированными глиомами такая терапия не приводит к ремиссии и выздоровлению. Тем не менее, применение анти-VEGF-препаратов для ингибирования ангиогенеза в опухолевой ткани продемонстрировало многообещающие клинические результаты и значительный потенциал в лечении метастазирующих и первичных опухолей.

Экспериментальные данные показали, что неизбежно развивается резистентность опухоли к антиангиогенной терапии. Вероятно, механизмы сопротивления включают активацию альтернативных проангиогенных сигнальных каскадов вместе с увеличением экспрессии факторов роста [14], а также увеличение вклада периваскулярного инвазивного роста в прогрессию опухоли [42, 47, 81–83]. По-видимому, антиангиогенная терапия может стимулировать клетки глиомы к миграции за пределы опухолевого очага, активируя инвазивный рост опухоли; эта клеточная популяция способна расти в отсутствие ангиогенеза за счет поглощения существующих микрососудов [83, 85, 92].

Есть основания полагать, что фундаментальные исследования неопластического ангиогенеза, событий опухолевой трансформации и формирования устойчивости приведут к разработке более эффективных методов лечения. Наиболее многообещающей представляется стратегия комплексной антиангиогенной терапии, включая ингибирование альтернативных проангиогенных путей, совместно с антиинвазивными препаратами, препятствующими локальной инвазии и метастатическому распространению.

REFERENCES

1. Folkman J. Angiogenesis. *Annu. Rev. Med.* 2006; 57: 1–18.
2. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Med.* 2003; 9 (6): 669–676.
3. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature Rev. Cancer.* 2002; 2 (10): 795–803.
4. Guiu S. et al. Bevacizumab/irinotecan. An active treatment for recurrent high grade gliomas: preliminary results of an ANOCEF Multicenter Study. *Rev. Neurol.* 2008; 164 (6–7): 588–594.
5. Norden A.D. et al. Bevacizumab for recurrent malignant gliomas: efficacy, toxicity, and patterns of recurrence. *Neurology.* 2008; 70 (10): 779–787.
6. Pope W.B., Lai A., Nghiemphu P. et al. MRI in patients with high-grade gliomas treated with bevacizumab and chemotherapy. *Neurology.* 2006; 67 (11): 1258–1260.
7. Norden A.D., Drappatz J., Wen P.Y. Antiangiogenic therapies for high-grade glioma. *Nature Rev. Neurol.* 2009; 5 (11): 610–620.
8. Narayana A. et al. Antiangiogenic therapy using bevacizumab in recurrent high-grade glioma: impact on local control and patient survival. *J. Neurosurg.* 2009; 110 (1): 173–180.
9. Nghiemphu P.L. et al. Bevacizumab and chemotherapy for recurrent glioblastoma: a single-institution experience. *Neurology.* 2009; 72 (14): 1217–1222.
10. Poulsen H.S. et al. Bevacizumab plus irinotecan in the treatment of patients with progressive recurrent malignant brain tumours. *Acta Oncol.* 2009; 48 (1): 52–58.
11. Zuniga R.M. et al. Efficacy, safety and patterns of response and recurrence in patients with recurrent high-grade gliomas treated with bevacizumab plus irinotecan. *J. Neurooncol.* 2009; 91 (3): 329–336.
12. Stupp R. et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009; 10 (5): 459–466.
13. Vredenburgh J.J. et al. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25 (30): 4722–4729.
14. Batchelor T.T. 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.

15. Ferrara N., Carver-Moore K., Chen H. et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996; 380 (6573): 439–442.
16. Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist*. 2004; 9: 2–10.
17. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997; 386 (6626): 671–674.
18. Hanai J., Dhanabal M., Karumanchi S.A. et al. Endostatin causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1. *J Biol Chem*. 2002; 277 (19): 16464–16469.
19. Rosen L.S. Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control*. 2002; 9: 36–44.
20. Robinson C.J., Stringer S.E. The splicevariants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci*. 2001; 114 (5): 853–865.
21. Miletic H. et al. Anti-VEGF therapies for malignant glioma: treatment effects and escape mechanisms. *Expert Opin*. 2009; 13 (4): 455–468.
22. Holmes K. et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal*. 2007; 19 (10): 2003–2012.
23. Ferrara N., Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997; 18 (1): 4–25.
24. Greenberg D.A., Jin K. From angiogenesis to neuropathology. *Nature*. 2005; 438 (7070): 954–959.
25. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis*. 2006; 9 (4): 225–230.
26. Brown L.F., Detmar M., Claffey K. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic. *Cytokine Exs*. 1997; 79: 233–269.
27. Dvorak H.F., Brown L.F., Detmar M. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol*. 1995; 146 (5): 1029–1039.
28. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J. Mol. Med*. 1999; 77 (7): 527–543.
29. Gerber H.P., Dixit V., Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem*. 1998; 273 (21): 13313–13316.
30. Gerber H.P., McMurtrey A., Kowalski J. et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem*. 1998; 273 (46): 30336–30343.
31. Testa J.R., Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2001; 98 (20): 10983–10985.
32. Lefranc F., Brotchi J., Kiss R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J. Clin. Oncol*. 2005; 23 (10): 2411–2422.
33. Soung Y.H., Lee J.W., Nam S.W. et al. Mutational analysis of AKT1, AKT2 and AKT3 genes in common human carcinomas. *Oncology*. 2006; 70 (4): 285–289.
34. Lamalice L., Houle F., Huot J. Phosphorylation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell migration in response to VEGF. *J. Biol. Chem*. 2006; 281 (45): 34009–34020.
35. Meadows K.N., Bryant P., Pumiglia K. Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *J. Biol. Chem*. 2001; 276 (52): 49289–49298.
36. Takahashi T., Yamaguchi S., Chida K. et al. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J*. 2001; 20 (11): 2768–2778.
37. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct. Funct*. 2001; 26 (1): 25–35.
38. Rak J., Yu J.L., Klement G. et al. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc*. 2000; 5 (1): 24–33.
39. Plate K.H., Breier G., Weich H.A. et al. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature*. 1992; 359 (6398): 845–848.
40. Shweiki D., Itin A., Neufeld G. et al. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J. Clin. Invest*. 1993; 91 (5): 2235–2243.
41. Weidner N., Semple J.P., Welch W.R. et al. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med*. 1991; 324 (1): 1–8.
42. Du R. 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.
43. Schmidt N.O., Westphal M., Hagele C. et al. Levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor and basic fibroblast growth factor in human gliomas and their relation to angiogenesis. *Int. J. Cancer*. 1999; 84 (1): 10–18.
44. Lee T.H., Avraham H.K., Jiang S. et al. Vascular endothelial growth factor modulates the transendothelial migration of MDA-MB-231 breast cancer cells through regulation of brain microvascular endothelial cell permeability. *J. Biol. Chem*. 2003; 278 (7): 5277–5284.
45. Jain R.K. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nature Med*. 2001; 7 (9): 987–989.
46. Jain R.K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*. 2005; 307 (5706): 58–62.
47. Holash J. et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*. 1999; 284 (5422): 1994–1998.
48. Poon R.T., Fan S.T., Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J. Clin. Oncol*. 2001; 19 (4): 1207–1225.
49. Millauer B., Shawver L.K., Plate K.H. et al. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature*. 1994; 367 (6463): 576–579.
50. Abramsson A., Berlin O., Papayan H. et al. Analysis of mural cell recruitment to tumor vessels. *Circulation*. 2002; 105 (1): 112–117.
51. Benjamin L.E., Keshet E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; 94 (16): 8761–8766.
52. Harmey J.H., Bouchier-Hayes D. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: implications for anti-angiogenic therapy. *Bioessays*. 2002; 24 (3): 280–283.
53. Tran J., Master Z., Yu J.L. et al. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99 (7): 4349–4354.
54. Toi M., Matsumoto T., Bando H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol*. 2001; 2 (11): 667–673.
55. Pegram M.D., Reese D.M. Combined biological therapy of breast cancer using monoclonal antibodies directed against HER2/neu protein and vascular endothelial growth factor. *Semin. Oncol*. 2002; 29: 29–37.
56. Nagy J.A., Benjamin L., Zeng H. et al. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis*. 2008; 11 (2): 109–119.
57. Bertolini F., Mingrone W., Alietti A. et al. Thalidomide in multiple myeloma, myelodysplastic syndromes and histiocytosis. Analysis of clinical results and of surrogate angiogenesis markers. *Ann. Oncol*. 2001; 12 (7): 987–990.

58. Iruela-Arispe M.L., Luque A., Lee N. Thrombospondin modules and angiogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 36 (6): 1070–1078.
59. D'Amato R.J., Loughnan M.S., Flynn E. et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91 (9): 4082–4085.
60. Chauv P., Moutet M., Faivre J. et al. 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.
61. Sallusto F., Cella M., Danieli C. et al. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 1995; 182 (2): 389–400.
62. Severin E.S., Rodina A.V. Problemy i perspektivy sovremennoj protivopuholevoj terapii. *Uspehi biologicheskoy himii.* 2006; 46: 43–64.
63. Menetrier-Caux C., Montmain G., Dieu M.C. et al. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD 34 (+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood.* 1998; 92 (12): 4778–4791.
64. Bergers G., Benjamin L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Rev. Cancer.* 2003; 3 (6): 401–410.
65. Lee C.G., Heijn M., di Tomaso E. et al. Anti-Vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Res.* 2000; 60 (19): 5565–5570.
66. Pham C.D., Roberts T.P., van Bruggen N. et al. Magnetic resonance imaging detects suppression of tumor vascular permeability after administration of antibody to vascular endothelial growth factor. *Cancer Invest.* 1998; 16 (4): 225–230.
67. Brasch R., Pham C., Shames D. et al. Assessing tumor angiogenesis using macromolecular MR imaging contrast media. *J. Magn. Reson. Imag.* 1997; 7 (1): 68–74.
68. Inai T., Mancuso M., Hashizume H. et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am. J. Pathol.* 2004; 165 (1): 35–52.
69. Borgstrom P., Gold D.P. et al. Importance of VEGF for breast cancer angiogenesis in vivo: implications from intravital microscopy of combination treatments with an anti-VEGF neutralizing monoclonal antibody and doxorubicin. *Anticancer Res.* 1999; 19 (5B): 4203–4214.
70. Teicher B.A., Holden S.A., Ara G. et al. Potentiation of cytotoxic cancer therapies by TNP-470 alone and with other anti-angiogenic agents. *Int. J. Cancer.* 1994; 57 (6): 920–925.
71. Zhou Q., Guo P., Gallo J.M. Impact of angiogenesis inhibition by sunitinib on tumor distribution of temozolomide. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14 (5): 1540–1549.
72. Bao S. et al. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* 2006; 66 (16): 7843–7848.
73. Calabrese C. et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell.* 2007; 11 (1): 69–82.
74. Marx J. Cancer research. Obstacle for promising cancer therapy. *Science.* 2002; 295 (5559): 1444.
75. Yu J.L., Rak J.W., Coomber B.L. et al. Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science.* 2002; 295 (5559): 1526–1528.
76. Wedam S.B., Low J.A., Yang S.X. et al. Antiangiogenic and anti-tumor effects of bevacizumab in patients with inflammatory and locally advanced breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24 (5): 769–777.
77. Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W. et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for the treatment of metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350 (23): 2335–2342.
78. Gomez-Manzano C., Holash J., Fueyo J. et al. VEGF Trap induces antiglioma effect at different stages of disease. *Neuro Oncol.* 2008; 10 (6): 940–945.
79. Samoto K., Ikezaki K., Ono M. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors. *Cancer Res.* 1995; 55 (5): 1189–1193.
80. Brown L.F., Berse B., Jackman R.W. et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum. Pathol.* 1995; 26 (1): 86–91.
81. Kunkel P. et al. Inhibition of glioma angiogenesis and growth in vivo by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2. *Cancer Res.* 2001; 61 (18): 6624–6628.
82. 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.
83. Paez-Ribes M. et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell.* 2009; 15 (3): 220–231.
84. Iwamoto F.M. et al. Patterns of relapse and prognosis after bevacizumab failure in recurrent glioblastoma. *Neurology.* 2009; 73 (15): 1200–1206.
85. Ebos J.M. et al. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell.* 2009; 15 (3): 232–239.
86. Erber R. 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.
87. Zagzag D. et al. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab. Invest.* 2006; 86 (12): 1221–1232.
88. Rubin J.B. et al. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100 (23): 13513–13518.
89. Singh S.K., Clarke I.D., Terasaki M. et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003; 63 (18): 5821–5828.
90. Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004; 432 (7015): 396–401.
91. Galli R., Binda E., Orfanelli U. et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 2004; 64 (19): 7011–7021.
92. Sakariassen P.O., Prestegarden L., Wang J. et al. Angiogenesis-independent tumor growth mediated by stem-like cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103 (44): 16466–16471.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Чехонин Владимир Павлович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН, заведующий Отделом фундаментальной и прикладной нейробиологии ФГУССП, заведующий кафедрой медицинских нанобиотехнологий РГМУ

Адрес: 119034, Москва, пер. Кропоткинский, д. 23

Тел.: (495) 695-02-62, факс: (495) 636-50-55

E-mail: chekhoninnew@yandex.ru

Гурина Ольга Ивановна, доктор медицинских наук, руководитель лаборатории нейрoхимии ФГУССП

Адрес: 117587, Москва, Варшавское шоссе, д. 114/1, кв. 364

Тел.: (495) 695-02-62

E-mail: olga672@yandex.ru

Корчагина Анна Александровна, аспирант кафедры медицинских нанобиотехнологий **Адрес:** 121601, Москва,

Филевский бульвар, д. 11, кв. 84

Тел.: (910) 433-17-76

E-mail: avilis1@yandex.ru

Шеин Сергей Александрович, аспирант кафедры медицинских нанобиотехнологий

Адрес: 119634, Москва, ул. Лукинская, д. 11, кв. 191

Тел.: (916) 108-35-09

E-mail: atomos@rambler.ru

Учреждения, в которых выполнена работа: Федеральное государственное учреждение «Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им. В.П. Сербского» Министерства здравоохранения и социального развития

Адрес: 119034, Москва, Кропоткинский пер., д. 23

E-mail: center@serbsky.ru

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский государственный медицинский университет им. Н.И. Пирогова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1

E-mail: atomos@rambler.ru