

О.Є. Новак

І.О. Лісняк

В.Ф. Чехун

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

Київська міська онкологічна лікарня, Київ, Україна

Ключові слова: ангіогенез, фактор росту ендотеліальних клітин (VEGF), злоякісні пухлини, антиангіогенна терапія.

АНГІОГЕНЕЗ У РОЗВИТКУ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН: ТЕОРЕТИЧНІ І ПРАКТИЧНІ АСПЕКТИ

Резюме. Узагальнені результати експериментальних та клінічних досліджень останніх років, присвячених визначенню ролі ангіогенезу в розвитку пухлинного процесу. Обговорені механізми регуляції ангіогенезу, значення неоваскуляризації в прогресуванні та метастазуванні пухлин, методи її дослідження та критерії оцінки. У більшості робіт встановлено, що щільність мікросудин та їх розподіл в пухлині є факторами прогнозу. Розглянуті нові підходи до лікування хворих зі злоякісними новоутвореннями — антиангіогенна терапія з використанням факторів, що пригнічують ангіогенез на різних етапах розвитку неопластичного процесу.

Протягом останніх років проводиться все більше досліджень, присвячених вивченню механізмів ангіогенезу при пухлинному процесі. Встановлено, що у пухлинах постійно відбуваються компенсаторно-приспосувальні реакції, спрямовані на покращання їх кровопостачання шляхом утворення нових судин. Вперше на значення ангіогенезу в розвитку пухлин звернув увагу J. Folkman [1]. За результатами досліджень, проведених протягом останніх років, доведено, що від інтенсивності ангіогенезу значною мірою залежить співвідношення процесів проліферації і апоптозу пухлинних клітин, ріст і метастазування новоутворень [2, 3]. На думку J. Pluda [4], пухлина на початковому етапі розвитку може знаходитись у «сплячому стані», поки не сформується її певний ангіогенний потенціал, який реалізується насамперед через секрецію пухлинними клітинами ангіогенних факторів [5]. J. Folkman запропонував узагальнену назву таких факторів — tumor angiogenic factor (TAF). Але в подальшому, в результаті удосконалення хроматографічних методів виділення та очищення білків, була ідентифікована ціла низка факторів: FGF (Fibroblast Growth Factor), IGF (Insuline-like Growth Factor), TGF (Trombocyte Growth Factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor), що беруть участь в ангіогенезі і які виявляють під час росту злоякісних пухлин.

Серед факторів, які продукує пухлина, найбільш високоспецифічним по відношенню до ендотеліальних клітин є фактор росту ендотеліальних клітин — VEGF, до якого клітини судинного ендотелію мають 2 рецептори — VEGF-RI та VEGF-R2. Цей фактор спершу був описаний як фактор проникності судин (Permeability Vascular Factor — PVF), що корелює з активністю плазміногену урокіназного типу і який виявляють у пухлинах [6, 7]. Сім'я VEGF складається із 5 членів — VEGF-A, -B, -C, -D, -E. Достатньо вивченим є VEGF-A — глікопротеїн, експресія якого найбільш виражена та важлива для ангіогенезу і який є мішенню для низки інгібіторів пухлинного росту.

Виявлено, що VEGF/VPF експресується у трансформованих або пухлинних клітинах під впливом мутантних онкогенів родини RAS (*H-ras*, *K-ras*), *v-src*, *v-raf* [8, 9]. Серед генів, що мають зв'язок з ангіогенезом, велике значення надається також гену *CYR61* [10], який експресується у фібробластах. Результатом такої експресії є посилення міграції та адгезії ендотеліальних клітин, що призводить до стимуляції ангіогенезу. Встановлено, що експресію генів у солідних пухлинах можуть модулювати фактори мікрооточення пухлинних клітин, зокрема, індукований гіпоксією фактор-1 (Hypoxia-inducible Factor — HIF-1), який також впливає як на розвиток судин, так і на ріст новоутворень [11, 12]. Про це свідчать результати експериментальних досліджень, в яких було встановлено, що HIF індукує експресію VEGF шляхом активації *c-src* [13, 14]. VEGF локалізується у цитоплазмі ендотеліальних клітин і у клітинах, що знаходяться поряд із судинами, як це було визначено на прикладі раку печінки [15].

Вивченню відношень між трансформованими клітинами та іншими, що входять до складу «пухлинної маси», в останні роки надається все більше уваги. Існує думка, що видозмінена строма першою впливає на стан клітин, які прилягають до неї, індукуючи розвиток новоутворення [16, 17]. Висловлено припущення, що імунокомпетентні клітини, які знаходяться у безпосередній близькості до венул і капілярів, можуть опосередковано впливати на проліферацію клітин строми, у тому числі клітинних елементів судинної стінки [18]. На проліферацію ендотелію можуть також впливати кількісні та якісні зміни протеогліканів. Останні, виділені із раку молочної залози, стимулюють проліферацію ендотелію на відміну від протеогліканів незміненої молочної залози [19].

Існують дані про участь в ангіогенезі пухлин тромбоцитів, які можуть бути як стимуляторами, так і інгібіторами васкуляризації за рахунок зміни антитромботичних властивостей ендотелію [20]. Цитокини також індукують експресію факторів транс-

крипції у фіброблотах строми, що оточують пухлину, та в ендотеліальних клітинах кровоносних судин, але тільки під час неоваскуляризації. У цей період фіброблоти експресують також деякі металопротеїнази (колагеназа, серинові протеази, стрептолізин I), що сприяють подальшій експансії пухлинного росту [21, 22]. Серинові протеази, що експресуються в інвазивних локусах (урокиназний тип плазміногенного активатора), відіграють важливу роль у метастазуванні. Їх активність регулюється двома інгібіторами, один із яких є маркером поширеного ангіогенезу в пухлині [23].

За допомогою комп'ютерного аналізу результатів відеозйомки судин в експерименті вивчено адгезивність, проникність, тромбогенність і тромборезистентність судинного мікроциркуляторного русла. У разі росту лімфосаркоми Плісса спостерігалися порушення мікроциркуляції, а саме посилення адгезивності лімфоцитів до ендотелію і проникності судин, зменшення тромборезистентних властивостей, зміни (кількісні та/або якісні) рецепторів дексаметазону на клітинах ендотелію [24]. Отже, до позитивної ангіогенної відповіді приводить не тільки комбінація мутацій або делецій різних супресорних генів і суперекспресія деяких онкогенів, але й комплекс ростових факторів, які індують ангіогенез.

Вивчення неоваскуляризації у пухлинах стало можливим завдяки таким експериментальним моделям, як імплантація камер з пухлинними клітинами під шкіру тварин, а також використанню імуногістохімічних методів дослідження видалених пухлин [20, 21, 25, 26]. Дослідження, проведені з урахуванням нових методичних підходів, дозволили встановити, що неоваскуляризація при пухлинному рості — це процес розвитку судин шляхом утворення паростків у вигляді капілярів із нормальних передіснуючих мікросудин. Новостворені судини є морфологічно незрілими, мають редуковану базальну мембрану і характеризуються підвищеною проникністю у порівнянні з неураженими судинами [27, 28]. Характер росту судин у пухлинах відрізняється від такого у постнатальному онтогенезі людини, при якому судини проліферують шляхом формування поодиноких судин за рахунок відпочкування ростових зачатків, розвиток яких завершується зв'язком двох функціонуючих термінальних судинних або шляхом утворення супутників, з'єднаних анастомозами з ростовими зачатками і з тими ж мікросудинами, від яких вони відпочувались [29].

При подальшому вивченні морфофункціональної характеристики мікросудин на декількох моделях пухлинного росту встановлено [6], що, по-перше, судини в середині пухлини є типовими венулами, які вистлані ендотелієм неперервного типу із закритими міжэндотеліальними сполученнями. У той самий час ці судини характеризуються підвищеною проникністю стінки для високомолекулярних речовин. По-друге, підвищення проникності судин

у солідних пухлинних вузлах не є наслідком розширення міжэндотеліальних сполучень, пошкодження стінки судин, їх структурних дефектів або результатом розвитку особливих типів ендотелію (синусоїдальний, фенестрований). По-третє, підвищення концентрації мічених макромолекул обумовлено не тільки їх збільшенням виходом за межі судинної стінки, але й за рахунок зниженого їх кліренсу. Нерівномірність проникності мікросудин у різних типах пухлин більше залежить від ступеня зложкості пухлинного процесу, а не від його локалізації [30]. В огляді літератури, присвяченому дисфункції ендотелію мікросудин як фактора метастазування, зроблено висновок, що найбільш важливим фактором взаємодії пухлинних клітин і ендотелію є його паранеопластична дисфункція, що залежить від ступеня пухлиноіндукованого впливу і проявляється змінами таких функцій ендотелію, як адгезивність, проникність, тромбогенність, тромборезистентність, які мають значення у метастатичному процесі [30]. Слід відзначити, що зміни проникності мікросудин у різних пухлинах неоднакові, від чого, можливо, залежить індивідуальна ефективність проти-пухлинного лікування.

Найвища активність ангіогенезу спостерігається при переході передраку в рак, що виявлено під час вивчення щільності судин при CIN (Cervical Intraepithelial Neoplasia — цервікальна інтраепітеліальна неоплазія) шийки матки та її прогресії в інвазивний рак [31].

У роботах, присвячених визначенню хімічного канцерогенезу, встановлено, що ангіогенез залучається у найбільш ранні стадії утворення папілом, а на пізніх стадіях розвитку раку спостерігається лише збільшення розміру кровоносних судин. У метастазах ангіогенез виражений більше, ніж у первинній пухлині [5]. У новоутвореннях, що не мають капсули, ангіогенез також більше виражений, ніж у пухлинах з капсулою. Цікавим є факт, що в одній пухлині існують різні субпопуляції клітин, варіабельні за схильністю до неоваскуляризації та індуквання пухлинного ангіогенезу. Існує думка, що провідну роль у зміні особливостей мікросудинного русла відіграє тривалість пухлинного процесу, а не обсяг пухлини [32].

Вивчаючи початкові стадії ангіогенезу на ранніх етапах онкогенезу *in vivo* шляхом імплантації у «віконце» в шкірі 20–50 клітин із пухлинних ліній молочної залози миші і щура, було встановлено, що модифікація васкуляризації тканин хазяїна спостерігалась, коли кількість пухлинних клітин досягала 68–80, а нові судини з'явилися зі збільшенням кількості клітин до 100–300. У пухлинних клітинах відбувався хемотаксисоподібний рух у напрямку до існуючих судин хазяїна. Такий ріст прослідковано від кількості клітин (20–50) до розміру пухлини (4–7) мм у діаметрі (близько декількох мільйонів клітин) [25]. Якщо пухлина вже мала ангіогенний фенотип під час трансплантації, то судини починали розвиватися задовго

до того моменту, коли пухлина досягне граничного обсягу невазуляризованої пухлини, а саме 0,2 мм у діаметрі (10^5 – 10^6 клітин) [2].

Згідно з даними експериментальних досліджень судини після імплантації пухлини починають рости на 2-гу–7-му добу, при цьому в ендотелії імплантованої пухлини вже через 2 год після імплантації починаються дегенеративні зміни, які закінчуються через 24 год. Пухлинний імплантат оточується недиференційованою сполучною тканиною, при цьому кількість тучних клітин зростає у 40 разів. Новостворені судини завжди проростають у пухлину із тканин організму, в яку імплантовано пухлину. У цитоплазмі ендотеліоцитів, що прилягають до пухлини, збільшується кількість мітохондрій, рибосом, елементів ендоплазматичної сітки, комплексу Гольджі. У кінці другої доби в ендотеліоцитах з'являються псевдоподії у напрямку до пухлини, а на 5–6-ту добу вже є численні кровоносні судини. Розмноження пухлинних клітин починається тоді, коли відбувається контакт між судинами і пухлинними клітинами. З ростом пухлини збільшуються кількість судин, відстань між капілярами, довжина та діаметр капілярів. Зі збільшенням відстані від стінки судин знижується мітогічна активність пухлинних клітин і зменшується кількість клітин у стані апоптозу [25]. Слід відзначити і такий цікавий факт, що трансформовані клітини пухлин більш ефективно відповідають на ангіогенні стимули, коли мають видовжену або розпластану, ніж округлу форму [2].

Той факт, що пухлинні й ендотеліальні клітини можуть подавати хемотаксис-сигнали ще невідомої природи, які притягують ці клітини одна до одної, розцінюється як етап адаптації пухлинних клітин до навколишнього середовища. Потенціальними кандидатами на такі сигнали можуть бути кисень, поживні речовини, ростові фактори або цитокіни.

Розрізняють 4 стадії неангіогенезу: 1 — міграція пухлинних клітин до існуючих судин ще до появи неовазуляризації; 2 — зміни в оточуючих пухлинний зачаток судинах — вазодилатація та збільшення звивистості судин на стадії розвитку пухлини з кількістю 60–80 клітин; 3 — утворення нових судин при кількості пухлинних клітин 100–300; 4 — інтимний контакт клітин неосудин із пухлиною у міру експансії пухлини в оточуючі неуразжені тканини. На цих стадіях формуються наступні етапи неовазуляризації при розвитку пухлинного росту: розшарування базальної мембрани протеазами пухлинних клітин або клітин хазяїна, активація ангіогенного фактора пухлинних клітин, міграція та проліферація ендотеліальних клітин, утворення капілярів [25].

Новоутворені судини у злоякісних пухлинах невеликі за розміром і прості за структурою. При швидкому рості пухлин вони складаються із каналів, які обмежені тільки ендотелієм або пухлинними клітинами. Судинна мережа злоякісних пухлин характеризується різноманітними структурними і функціональними змінами (відсутність колатералей, наявність дилатації,

артеріовенозних шунтів, трифуркації судин) [5]. У новоутворених судинах відсутні прецити та м'язовий прошарок; цим судинам не властива й іннервація. Лише окремі дослідники вважають, що з ростом пухлин судини стають більш диференційованими, і в них розвивається м'язовий прошарок.

Останніми роками опубліковано ряд робіт, в яких ангіогенез розглядається як фактор, що значною мірою впливає на клінічний перебіг і прогноз пухлинного процесу, а концентрація VEGF у пухлині і крові — як маркер для контролю за перебігом хвороби та для прогнозу [33–35]. Так, ступінь вираженості пухлинного ангіогенезу є прогностичним критерієм при мезотеліомі [36]. У хворих з нейробластомою рівень ангіогенезу корелює з метастазуванням, ампліфікацією *N-myc* і несприятливим прогнозом [37]. Щільність судин у рецидивах гігантоклітинних пухлин кісток була більш високою, ніж у первинній пухлині [38]. Це свідчить, що неовазуляризація часто корелює з біологічною агресивністю і злоякісністю пухлин і залежить від кінетичних особливостей новоутворення [39].

Ангіогенну активність пухлини відображає показник інтрамуральної щільності мікросудин. Існує декілька методів вивчення особливостей ангіогенезу у видалених пухлинах — підрахунок мікросудин у васкуляризованих полях пухлини [40–42], визначення індексу васкуляризації (відносне число мікросудин на певну площу пухлини, найчастіше на 1 мм^2 гістологічного препарату), імуногістохімічний метод визначення VIII фактора (фактора Віллебранда) [43, 44].

Досліджуючи особливості ангіогенезу паралельно із визначенням експресії Ki-67, p53 і p21 в клітинах раку ендометрія, було виявлено, що щільність мікросудин на 1 мм^2 пухлинної тканини дорівнювала в середньому 67 (від 22 до 233). Зв'язку між судинною щільністю, віком хворих і експресією Ki-67 не виявлено. Одночасно виживаність хворих була значно меншою, якщо на 1 мм^2 припадало більше 90 мікросудин. Якщо щільність судин була меншою за 66 на таку саму площу пухлини, її коливання не впливали на виживаність пацієнтів [39]. При визначенні кількості судин (імуногістохімічне фарбування на фактор Віллебранда) у злоякісних пухлинах шлунка виявлені коливання від 39,8 до 46,4 мікросудин. Кількість судин була достовірно більшою у хворих з метастазами в печінці та лімфатичних вузлах, а також при інвазії пухлини до сусідніх органів. Виживаність хворих з гіповаскуляризацією пухлин була більшою, ніж при гіперваскуляризації [40]. При дослідженні ангіогенезу у хворих на інтраепітеліальний рак шийки матки встановлено, що кількість судин на 1 мм^2 гістологічного препарату найбільша при CIN3: $34,1 \pm 1,8$ проти $19,4 \pm 1,4$ при CIN1. Аналогічним чином змінюється і продукція VEGF, рівень якого при CIN3 вищий, ніж при CIN1 ($12,2 \pm 0,8$ і $8,3 \pm 0,8$ відповідно) [31]. При VIN (Vulvar Intraepithelial Neoplasia — інтраепітеліальна неоплазія вульви) кількість судин на 1 мм^2 гістологічного препарату також залежить від стадії процесу: при VIN1 вона становить $4,4 \pm 0,8$, при VINIII — $9,9 \pm 0,6$ [47].

При раку яєчника ІІІС стадії було порівняно площу ендотелію на 1 мм^2 пухлини у хворих, які померли, і у тих, хто залишались живими: $0,110 \pm 0,034$ і $0,038 \pm 0,026\text{ мм}^2$ відповідно. Площа ендотелію не залежала від ступеня диференціювання пухлин, стану лімфатичних вузлів чи маси залишкової пухлини [48]. Виявлено також, що VEGF є незалежним прогностичним фактором у хворих на рак стравоходу [44], рак шийки матки ІВ стадії [45], нейробластоми [46].

При недрібноклітинному раку легені не виявлено кореляції між інтенсивністю ангиогенезу і прогнозом хвороби [49]. Подібна кореляція була відсутня і при злоякісних пухлинах молочної залози [50], хоча виявлено позитивну кореляцію між внутрішньопухлинною щільністю судин і мітотичною активністю пухлинних клітин та кількістю макрофагів у пухлині, а також обернену кореляцію з апоптичним індексом [14].

В клінічних умовах важливими є результати дослідження зв'язку між ангиогенезом і апоптозом пухлинних клітин. Хоча p53 — найбільш відомий фактор апоптозу пухлинних клітин, деякі автори приписують йому й інші функції, а саме блокування ангиогенної активності пухлин шляхом експресії p53 дикого типу, що було встановлено в експериментальних дослідженнях на прикладі фібросаркоми у миші [51]. Вираженість апоптозу та пригнічення ангиогенезу в пухлині зростали після внутрішньоартеріальної хіміотерапії, яку проводили хворим на рак шийки матки [45]. При вивченні ангиогенезу як фактора клінічного прогнозу раку гортані І–ІV стадії відзначено, що безрецидивний перебіг хвороби корелював з кількістю судин у «гарячих ділянках» пухлини: у хворих з кількістю судин більше 130 на 1 мм^2 спостерігались рецидиви через 60–84 міс після хірургічного або комбінованого лікування [52].

З ангиогенезом пов'язані також порушення реологічних властивостей крові в осіб з онкологічними захворюваннями, а саме коливання в'язкості крові і плазми, гіперкоагуляція еритроцитів, зниження їх деформованості, причому гіперкоагуляційні зміни в системі еритроциту та їх глибина залежить від поширеності пухлинного процесу [53]. Виявлено обернену кореляцію між рівнем фактора Віллебранда і активацією макрофагів. Цисплатин і доксорубіцин (у культурі ендотеліальних клітин людини) підвищують рівень фактора Віллебранда, що може мати значення для механізмів розвитку тромботичних ускладнень під час хіміотерапії хворих на рак [54].

Фактор росту ендотеліальних клітин, який виділяє тромбоцити, аналогічний тимідинфосфорилази і також належить до ангиогенних факторів. При раку яєчника його експресія у стромі виявляється в 80% спостережень і залежить від гістологічної будови раку (при псевдомуцинозному раку більше, ніж при серозному), а також від стадії хвороби (при раку ІІІ стадії експресія цього фактора в стромі більша, ніж при І стадії) [55].

При аденокарциномі ендометрію неоваскуляризація виражена більше, ніж у незміненому ендометрії, при цьому порушується архітектоніка судинної мережі — з'являються термінальні судини, від яких відходять непропорційно малі та широкі судини у вигляді паростків, які стають більш вузькими на поверхні ендометрія, утворюючи спіральні або Y-подібні фігури. Описані зміни судинної системи при аденокарциномі ендометрія можуть свідчити про інтенсивну неоваскуляризацію пухлини [56]. Більшість дослідників стверджують, що щільність судин є незалежним прогностичним фактором солідних пухлин молочної залози, яєчника і товстої кишки. У разі високої щільності судин на одиницю поля прогноз погіршується.

Поряд з визначенням показника щільності судин як фактора прогнозу пухлинного процесу важливим є дослідження рівня експресії та продукції VEGF — найбільш активного та значущого індуктора пухлинного ангиогенезу. Вивчення VEGF шляхом гібридизації *in situ* у злоякісних пухлинах яєчника, видалених у 68 хворих, довело його гіперекспресію лише у 29 хворих, серед яких лише у 25% не було жодних проявів рецидиву хвороби. Навпаки, серед хворих, у пухлинах яких не спостерігалась гіперекспресія VEGF, ознаки рецидиву були відсутні у 75% випадків. Виявлена неоднакова тривалість безрецидивного періоду — 22 міс у хворих з VEGF-позитивними пухлинами проти 108 міс у хворих з VEGF-негативними пухлинами. За даними багатофакторного аналізу показників прогнозу (вік хворих, стадія пухлинного процесу, ступінь диференціювання пухлини, її розмір, цитологічна характеристика, експресія VEGF) встановлено, що підвищення експресії VEGF у пухлинах достовірно пов'язано з гіршим прогнозом хвороби, тому подальше вивчення VEGF може бути корисним для виявлення хворих з потенційно високим ризиком рецидиву раку яєчника [50]. Важливим у цьому плані є виявлення експресії VEGF в асцитній рідині і в рідині кіст яєчника [57, 58,] що може мати діагностичне значення.

Рівень VEGF у хворих на рак яєчника був вищим, ніж у хворих з доброякісними пухлинами тієї самої локалізації, і складав 229,9 і 140 нг/мл відповідно. У хворих на пізніх стадіях розвитку пухлинного процесу високий рівень VEGF був пов'язаний з наявністю асцити в цих хворих і не корелював із відповіддю на хіміотерапію. Автори вважають, що рівень VEGF свідчить про процес пухлинної прогресії і пов'язаний з розвитком асцити у хворих на рак яєчника [59].

У сироватці крові хворих на рак легені рівень VEGF був більш високим (834 нг/мл), ніж у хворих з доброякісними новоутвореннями цього органа (264 нг/мл), проте не залежав від гістологічної будови пухлини, стадії пухлинного процесу чи наявності метастазів [60]. У регуляції VEGF, тобто у зниженні його експресії, має значення інактивація мутантного алеля онкогена *K-Ras*, що продемонстровано і в клітинних лініях раку ободової і прямої кишки [61].

При недрібноклітинному раку легені виявлена кореляція VEGF із його рецептором R1, проте не встановлено зв'язку між кількістю судин, експресією VEGF і його рецепторів у клітинах ендотелію та фібробластах, у пухлинних клітинах і показниками виживаності хворих [62]. Не знайдено також різниці за ступенем судинного росту при інвазивному протоковому раку молочної залози (дослідження центральних і периферичних зон пухлини) і в неуразеній тканині [63]. Тому вважають, що експресія VEGF, як і втрата дикого типу p53, є незалежними факторами прогнозу і метастазування злоякісних пухлин [64, 65].

Вказуючи на велике значення ангиогенезу як основного процесу для росту і метастазування пухлин, деякі автори зазначають, що ангиогенез — це складний фізіологічний процес, прогностичне значення якого у перебігу онкологічних захворювань потребує подальшого вивчення.

Результати досліджень останніх років свідчать, що феномен резистентності злоякісних пухлин до хіміотерапії має складний плейотропний механізм, детермінантою якого є комплекс факторів, які можна поділити на дві групи — генетичні та епігенетичні [66–68]. У ролі генетичних факторів хіміорезистентності виступають онкогени та продукти їх експресії, насамперед Bcl-2 і p53, що беруть участь у механізмах апоптозу. Разом з цим встановлено, що виживання клітин після хіміотерапії залежить не тільки від їхньої резистентності, але й від їх мікрооточення [69, 70], а саме від взаємодії з екстрацелюлярним матриксом і клітинно-клітинних контактів.

Такі фактори мікрооточення пухлинних клітин, як гіпоксія і рН, а також особливості ангиогенезу також є епігенетичними факторами, що мають значення у хіміорезистентності злоякісних новоутворень. Серед цих факторів центральна роль відводиться ангиогенезу, оскільки від нього залежать ріст пухлини, здатність її до інвазії і метастазування, тобто подальша її прогресія [71, 72].

Одним із перспективних підходів до контролю росту пухлин є вплив на її систему судин. За останні 10 років такий підхід, як ефективний метод терапії хворих на рак, став можливим завдяки появі нових фармакологічних засобів, дія яких спрямована на судини пухлин [73, 74]. Оскільки розвиток злоякісних новоутворень пов'язаний з активною неоваскуляризацією, антиангіогенна терапія в онкологічній практиці є досить обґрунтованою.

Ефективність антиангіогенної терапії при захворюваннях, пов'язаних з процесами неоваскуляризації, може бути зумовлена двома положеннями: 1 — під час проведення антиангіогенної терапії відсутній вплив на існуючу кровотворну сітку; 2 — ендотеліальні клітини при застосуванні антиангіогенних препаратів не виявляють резистентності до ліків.

Виходячи з цього, розробляється декілька шляхів інгібіції неоваскуляризації, застосування яких можливе у лікуванні хворих на рак. Одним із таких шляхів є блокування ангиогенних індукторів, зокрема

VEGF. Оскільки вказаний фактор є ключовою ланкою в індукції пухлинного ангиогенезу, більшість експериментальних досліджень з антиангіогенної терапії спрямовані саме на вивчення шляхів інгібування VEGF. Існує три потенціальних напрямки для блокування активності цього фактора: інгібіція секреції VEGF; інактивація VEGF; блокада рецепторів VEGF в ендотеліальних клітинах. Пригнічення секреції фактора досягається застосуванням антисмислових олігонуклеотидів проти VEGF, що забезпечує регресію раніше індукованих судин сітківки в експериментальних моделях на тваринах [75]. Антисмислові кодони взаємодіють з m-RНК фактора, інгібуючи трансляцію нормального VEGF [76]. Завдяки застосуванню моноклональних антитіл проти VEGF також забезпечується регресія новоутворених судин: механізм дії антитіл ґрунтується на їх зв'язку із фактором, що призводить до повної його інактивації. В експериментальних умовах застосування препаратів TBC 1465 і TBC 1466, дія яких пов'язана з блокадою рецепторів VEGF, забезпечує у тварин регресію індукованої неоваскуляризації в сітківці [77]. Описані вище препарати на даний момент проходять експериментальні випробовування.

Іншим перспективним напрямком може бути застосування фармакологічних препаратів, дія яких спрямована на зниження проліферації ендотеліальних клітин та їх взаємодію з оточуючим екстрацелюлярним матриксом, зокрема, з інтегринами. Одними з найбільш активних препаратів з таким механізмом дії є вітаксин і TNP-470. Дія першого спрямована на блокування активних адгезивних компонентів матриксу — інтегринів, другого — аналога фумагиліну — на селективну блокаду проліферації і міграції ендотеліальних клітин [78]. При антиангіогенній терапії знижується щільність судин у пухлині, ступінь їх арборизації і середній діаметр [79].

Важливим напрямком в терапії онкозахворювань є застосування фармакологічних препаратів, які здатні інактивувати матриксні металопротеїнази — ферменти, що забезпечують деградацію екстрацелюлярного матриксу. Препарати з таким механізмом дії на сьогодні застосовують для терапії захворювань з неоваскулярною компонентою [80–82]. Виявлено також, що клотримазол може бути інгібітором ангиогенезу, а саме двох його основних компонентів — проліферації і міграції ендотеліальних клітин. Виявлена антиангіогенна дія едельфозину *in vivo* та *in vitro* [83]. Описана регуляція VEGF за допомогою ретиноїдів [84]. Можливість і перспективність антиангіогенної терапії ґрунтовно висвітлені в огляді літератури [85], в якому автори розглядають VEGF — залежний ангиогенез як мішень для протипухлинної терапії раку молочної залози і наводять ряд фармакологічних препаратів з антиангіогенною дією.

Отже, наведені дані літератури свідчать, що ангиогенез є невід'ємною ланкою бластомогенезу, від якого залежать ріст та метастазування пухлин. Ангиогенез при неопластичному рості є складним і остаточно не

вивченим процесом, в якому бере участь велика кількість регуляторних факторів, серед яких найважливіша роль належить VEGF. Характерно, що VEGF проявляє свої мітогенні властивості лише до ендотеліальних клітин. Ангіогенез розпочинається на початкових стадіях росту пухлин і може бути зумовлений як факторами мікрооточення пухлин, так і експресією багатьох генів пухлинних клітин. Незважаючи на значну кількість робіт, присвячених ролі ангіогенезу, існують протилежні думки щодо його значення в клінічному перебігу, метастазуванні і прогнозі пухлинного процесу, хоча більшість авторів вважають, що ангіогенез та його показники (кількість VEGF у сироватці крові, висока щільність судин у пухлинах) є критеріями агресивності злоякісного росту і несприятливого прогнозу захворювання. Наявність неоднозначних оцінок щодо ролі ангіогенезу у прогресії пухлинного росту свідчить про необхідність подальшого вивчення механізмів і розроблення методології оцінки структурно-функціональних особливостей васкуляризації пухлин людини.

Оскільки індуктори ангіогенезу виявляються ще до початку неоваскуляризації, то вплив на механізми, пов'язані з індукцією та дією цих факторів, а також на інгібітори ангіогенезу може мати терапевтичний ефект. Мішенями для антиангіогенної терапії можуть бути ростові фактори, VEGF, його рецептори. Лікувальний вплив може бути спрямований або на попередження розвитку судин, або на селективну деструкцію вже існуючих судин. Найбільшого ефекту лікування, можливо, буде досягнуто при комбінації антиангіогенної і цитостатичної терапії. Підхід до лікування, який включає пригнічення ангіогенезу в пухлині, — новий стратегічний напрямок у терапії хворих на рак.

ЛІТЕРАТУРА

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; **285**: 1182–8.
2. Folkman J. Incipiens of angiogenesis in cancer. *J Nat Cancer Inst* 2000; **92**: 94–5.
3. Yu JL, Rak JW, Carmeliet P, *et al.* Heterogenous vascular dependence of tumor cell populations. *Am J Pathol* 2001; **158**: 1225–34.
4. Pluda JM. Clinical trials and development of inhibitors of angiogenesis. *Cancer Invest* 1998; **17**: 13–4.
5. Li X-M, Tang Z-Y, Qin L-Z, *et al.* Serum vascular endothelial growth factor is a predictor of invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma. *J Exp Cancer Res* 1999; **18**: 511–7.
6. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Review: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; **146**: 1029–39.
7. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrin Rev* 1997; **18**: 4–25.
8. Rak J, Films J, Finkenzeller, *et al.* Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastas Rev* 1995; **14**: 263–77.
9. Rak J, Vitsuhashi Y, Bayko L, *et al.* Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implication for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1995; **55**: 4575–80.
10. Babic AM, Kireeva ML, Kolesnikova TV, Lau LF. CYR 61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Cancer Acad Sci USA* 1998; **95**: 6355–60.
11. Shweiki L, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; **359**: 843–45.
12. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 8104–9.
13. Shi Q, Le X, Fabruzzese JL, *et al.* Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001; **61**: 4143–54.
14. Mukhopadhyay L, Tsiokas L, Zhou X-M, *et al.* Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-src activation. *Nature* 1995; **375**: 577–81.
15. Divan A, Lawry J, Dunsmore IR, *et al.* p53 and p21 waf-1 expression correlates with apoptosis or cell survival in poorly differentiated, but not well-differentiated retinoblastomas. *Cancer Res* 2001; **61**: 3157–63.
16. Kubitz M, Hickey L, Roberts G. Influence of host microvascular environment on tumour vascular endothelium. *Int J Exp Pathol* 1999; **80**: 1–10.
17. Gho YS, Kim P, Li H-C, *et al.* Stimulation of tumor growth by human soluble intercellular adhesion molecule-1. *Cancer Res* 2001; **61**: 4253–7.
18. Голубев ОА, Абросимов СЮ, Доросевич АЕ. Роль иммунокомпетентных клеток в морфогенезе фиброаденом молочных желез. Тез докл I съезда иммунол России. Новосибирск, 1992. 112 с.
19. Vijayagopal P, Figueroa JE, Levine EA. Altered composition and increased endothelial cell proliferative activity of proteoglycans isolated from breast carcinoma. *J Surg Oncol* 1998; **68**: 250–4.
20. Pinedo HM, Verheul HMV, D Amato RJ, Folkman G. Involvement of platelets in tumour angiogenesis? *Lancet* 1998; **352**: 1775–7.
21. Stehelin D. Similitudes entre les mechanisms de neoangiogenesis et de invasion tumorales. *C R Stances Soc Biol* 1998; **192**: 217–22.
22. Fujimoto M, Kiyosawa T, Murata S, *et al.* Vascular endothelial growth factor in angiosarcoma. *Anticancer Res* 1998; **18**: 3725–9.
23. Torre EA, Fulco RA. Tumor-associated urokinase-type plasminogen activator: significance in breast cancer. *Eur J Gynecol Oncol* 1996; **17**: 315–8.
24. Dubina MV, Petrishchev NN, Anisimov VN. Microvascular endothelium dysfunction during growth of transplanted lymphosarcoma and glioma in rats. *J Exp Clin Cancer Res* 1999; **18**: 537–42.
25. Li CY, Shan S, Huang Q, *et al.* Initial stage of tumor cell induced angiogenesis: evaluation via skin window chambers in rodent models. *J Nat Cancer Inst* 2000; **92**: 143–7.
26. Хавинсон ВХ, Южаков ВВ, Кветной ИМ, Малинин ВВ. Влияние эпителиона на кинетику роста и функциональную морфологию саркомы М-1. *Вопр онкологии* 2001; **47**: 461–6.
27. Olivares D, Ulbright T, DeRiese W, *et al.* Neovascularization in clinical stage A testicular germ cell tumor: prediction of metastatic disease. *Cancer Res* 1994; **54**: 2800–02.
28. Dellas A, Almendral AC, Torhorst J. Association of tumor induced vascularization with clinico-pathological parameters in cervical neoplasia. *Eur J Gynecol Oncol* 1997; **18**: 231–3.
29. Ярыгин НЕ, Кораблев АВ. Варианты роста кровеносных сосудов в пренатальном и постнатальном онтогенезе человека. Тез съезда Межд союза ассоц патологоанатомов. Москва, 1999: 347–8.
30. Петрищев НН, Дубина НВ. Дисфункция эндотелия микрососудов как фактор метастазирования. *Вопр онкологии* 1999; **45**: 484–92.
31. Dobbs SP, Johnson IR, Hewett P, Murray JC. Angiogenesis as a prognostic indicator in cervical intraepithelial neoplasia. *Eur J Gynecol Oncol* 1997; **18**: 220.
32. Дубина М.В. Влияние дексаметазона на функциональные свойства микрососудов у крыс с лимфосаркомой Плисса. *Вопр онкологии* 1999; **45**: 655–9.

33. Schoell WM, Fieber D, Reich O, *et al.* Tumor angiogenesis as a prognostic factor in ovarian carcinoma: quantification of endothelial immunoreactivity by image analysis. *Cancer* 1997; **80**: 2257–62.
34. Oehler MK, Caffier H. Diagnostic value of serum VEGF in women with ovarian tumors. *Anticancer Res* 1999; **19**: 2519–22.
35. Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, *et al.* Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 2001; **61**: 1786–90.
36. Kumar-Singh K, Vermeulen PB, Weyler J, *et al.* Evaluation of tumour angiogenesis as a prognostic marker in malignant mesothelioma. *J Pathol* 1997; **182**: 211–6.
37. Meitar D, Crawford SE, Rademaker A, *et al.* Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification and poor outcome in human neuroblastoma. *J Clin Oncol* 1996; **14**: 405–14.
38. Sulh MA, Greco VF, Jiang T, *et al.* Proliferation index and vascular density of giant cell tumors of bone: are the prognostic marker? *Cancer* 1996; **77**: 2044–51.
39. Salvesen HB, Iversen OE, Akslen LA. Prognostic significance of angiogenesis and Ki-67, p53 and p21 expression: a population based endometrial carcinoma study. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 1382–90.
40. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB. Quantification of angiogenesis in solid human tumors: an international consensus on the methodology and criteria evaluation. *Eur J Cancer* 1996; **32A**: 2472–84.
41. Sales A, Ruis A, Lombart-Bosch L. Comparative morphometric evaluation of microvessel density and nuclear area in ductal carcinoma in situ and hyperplastic ductal breast lesions. *Breast* 1999; **8**: 21–5.
42. Волченко НН, Завалишина ЛЭ, Петров АН, Лебедев ЭА. Сосуды стромы инвазивного протокового рака молочной железы. *Арх патологии* 1999; **61**: 35–38.
43. Wong NA, Willoats J, Kendall MJ, Shiffeld EA. An immunohistochemical study of the vascularization of well differentiated thyroid tumours. *J Pathol* 1997; **182**: (suppl) 43.
44. Shimada H, Takeda A, Nabeya K, *et al.* Clinical significance of serum vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2001; **92**: 663–9.
45. Ueda M, Ueki K, Kumagai K, *et al.* Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer* 1996; **32A**: 2451.
46. Canete A, Navarro S, Bermudez J, *et al.* Angiogenesis in neuroblastoma: relationship to survival and other prognostic factors in a cohort of neuroblastoma patients. *J Clin Oncol* 2000; **18**: 27–34.
47. Bancher-Todesca D, Obermair A, Bilgi S, *et al.* Angiogenesis in vulvar intraepithelial neoplasia (VIN) and in vulvar cancer. *Eur J Gynecol Oncol* 1997; **18**: 224.
48. Gadducci A, Ferdeghini M, Cosio S, *et al.* Preoperative serum E-cadherin assay in patients with ovarian carcinoma. *Anticancer Res* 1999; **19**: 769–72.
49. Offersen BV, Pfeiffer P, Hamilton-Dutoit S, Overgaard J. Patterns of angiogenesis in nonsmallcell lung carcinoma. *Cancer* 2001; **91**: 1500–9.
50. Vincent-Salomon A, Carton M, Zafrani B, *et al.* Long term outcome of small size invasive breast carcinomas independent from angiogenesis in a series of 685 cases. *Cancer* 2001; **92**: 249–56.
51. Holmgren L, Jackson G, Arbiser J. p53 induces angiogenesis — restricted dormancy in a mouse fibrosarcoma. *Oncogene* 1998; **17**: 819–24.
52. Beatrice F, Cammarota R, Giordano C, *et al.* Angiogenesis: prognostic significance in laryngeal cancer. *Anticancer Res* 1998; **18**: 4737–40.
53. Ганцев ШХ, Карабанов ГН, Огий ИИ. Гемореологические нарушения и их коррекция у онкологических больных. *Рос онкол журн* 1996; (1): 48–52.
54. Данилова АБ, Окулов ВБ, Данилов АО и др. Реакция эндотелия на воздействие химиотерапевтических препаратов и иммуномодуляторов. *Гематол и трансфузиол* 1998; **43**: 13–23.
55. Nakanishi Y, Kodama J, Tokumo K, *et al.* The expression of platelet-derived endothelial cell growth factor, thymidine phosphorylase associates with angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Int J Clin Oncol* 1997; **2**: 219–23.
56. Palczak R, Splawinski J. Angiogenic activity and neo-vascularization in adenocarcinoma of endometrium. *Int J Gynecol Obstet* 1989; **29**: 343–57.
57. Boss EA, Massuger LEAG, Thomas CMG, *et al.* Vascular endothelial growth factor in ovarian cyst fluid. *Cancer* 2001; **91**: 371–7.
58. Luo JC, Yamaguchi S, Shinkai A, *et al.* Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors. *Cancer Res* 1998; **58**: 2652–60.
59. Gadducci A, Fenocchi A, Ferdeghini M, *et al.* Serum preoperative vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian cancer: relationship with prognostic variables and clinical outcome. *Anticancer Res* 1999; **19**: 1401–6.
60. Takigawa N, Segawa Y, Fujimoto N. Elevated vascular endothelial growth factor levels in sera of patients with lung cancer. *Anticancer Res* 1998; **18**: 1251–4.
61. Okada M, Rak JW, Croix BS. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 3609–14.
62. Decaussin M, Sertelet H, Robert C, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-F1t1 and VEGF-R2-F1k1/KDR) in non-smallcell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. *J Pathol* 1999; **188**: 369–77.
63. Goede V, Flecktnstein G, Dietrich M, *et al.* Prognostic value of angiogenesis in mammary tumors. *Anticancer Res* 1998; **18**: 2199–202.
64. Linderholm B, Lindh B, Tavelin B, *et al.* p53 and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression predict outcome in 833 patients with primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 2000; **89**: 51–62.
65. Lee AH, Dublin EA, Bobrow LG, Poulson R. Invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast show distinct patterns of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *J Pathol* 1998; **185**: 394–401.
66. Shain KH, Dalton WS. Cell adhesion is a key determinant in de novo multidrug resistance (MDR): new targets for the prevention of acquired MDR. *Mol Cancer Ther* 2001; **1**: 69–78.
67. Shoemaker RH. Genetic and epigenetic factors in anticancer drug resistance. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**: 4–5.
68. Taylor ST, Yickman JA, Dive C. Epigenetic determinants of resistance to etoposide regulation of Bcl-X1 and BAX by tumor microenvironmental factors. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**: 18–23.
69. Fidler IJ. Angiogenic heterogeneity regulation of neoplastic angiogenesis by the organ microenvironment. *J Natl Cancer Inst* 2001; **93**: 1040–1.
70. West CML, Cooper RA, Lancaster JA, *et al.* Tumor vascularity: a histological measure of angiogenesis and hypoxia. *Cancer Res* 2001; **61**: 2907–10.
71. Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and metastases. *Eur J Cancer* 1996; **32A**: 2451–60.
72. Gasparini G. Angiogenesis in preneoplastic and neoplastic lesions. *Cancer J* 1995; **8**: 91–3.
73. Bloemendal HJ, Logtenberg T, Voest EE. New strategies in antivascular cancer therapy. *Eur J Clin Invest* 1999; **29**: 802–9.
74. Gordon MS. Vascular endothelial growth factor as a target for antiangiogenic therapy. *J Clin Oncol* 2000; **18**: 45–6.
75. Robinson GS, Pierce EA, Rook SL, *et al.* Oligodeoxynucleotides inhibit retinal neovascularization in the model of proliferative retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 4851–6.
76. Askary F, McDonell W. Antisense-oligonucleotide therapy. *N Engl J Med* 1996; **331**: 316–8.
77. Friedl D, Dooks P, Shaffer R, *et al.* Definition of two angiogenic pathways by distinct $\alpha_5\beta_1$ integrin. *Sci* 1995; **270**: 1500–2.
78. Hammers HP, Drownlee M, Jonzyk A, *et al.* Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin type I integrin inhibit retinal neovascularization. *Nat Med* 1996; **2**: 529–33.
79. Gee MS, Saunders HM, Lee JC, *et al.* Doppler ultrasound imaging detects changes in tumor perfusion during antivascular the-

rapy associated with vascular anatomic alterations. *Cancer Res* 2001; **61**: 2974–82.

80. **Isner JV, Asahara T.** Therapeutic angiogenesis. *Front Biosci* 1998; **3**: 49–69.

81. **Cheresh DA.** Cell adhesion and angiogenesis. *Trends in Cell Biology* 1996; **6**: 462–8.

82. **Nelson NJ.** Inhibitors of angiogenesis enter phase III testing. *J Nat Cancer Inst* 1998; **90**: 960–3.

83. **Vogler VR, Liu J, Volpert O, et al.** The anticancer drug edelfosine is a potent inhibitor of neovascularization in vivo. *Cancer Invest* 1999; **16**: 549–53.

84. **Diaz BV, Lemoir MC, Ladoux A, et al.** Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes by retinoids. *J Biol Chem* 2000; **275**: 642–50.

85. **Кушлинский НЕ, Герштейн ЕС.** Роль фактора роста эндотелия сосудов при раке молочной железы. *Бюл эксперим биол и мед* 2002; **133**: 604–12.

ANGIOGENESIS IN THE DEVELOPMENT OF MALIGNANT TUMORS: THEORETICAL AND PRACTICAL ASPECTS

O.E. Novak, I.O. Lisniak, V.F. Chekhun

Summary. Findings are summarized of experimental and clinical investigations conducted in recent years with the

view of studying the relevance of angiogenesis in the development of tumor process. The mechanisms of angiogenesis regulation are discussed as well as the involvement of neovascularization in the progression and metastasizing of tumors, investigation techniques and evaluation criteria. According to most reports, the density of microvessels and their distribution in the tumor are reckoned as prognostic factors. New approaches to treating malignant tumors are discussed, such as anti-angiogenic treatment in combination with factors that suppress angiogenesis at various stages of the development of neoplastic process.

Key Words: angiogenesis, vascular endothelial growth factor (VEGF), malignant tumors, anti-angiogenic treatment.

Адреса для листування:

Лісняк І.О.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України