

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр
онкологии им. Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

НИКУЛИЦКИЙ СЕРГЕЙ ИГОРЕВИЧ

**ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ И ЛОКАЛИЗАЦИИ РЕЦЕПТОРА VEGF-R1 В
ОПУХОЛЕВЫХ И НОРМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА**

14.01.12 онкология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Екатерина Григорьевна Тырсина

Москва, 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 4 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 11 |
| 1.1. Система VEGF/VEGF-R | 11 |
| 1.1.1. VEGF – фактор роста эндотелия сосудов | 12 |
| 1.1.2. Общая характеристика VEGF-рецепторов (VEGF-R) | 18 |
| 1.2. Рецептор фактора роста эндотелия сосудов 1 типа (VEGF-R1) | 23 |
| 1.2.1. Молекулярное строение VEGF-R1 и его изоформы | 23 |
| 1.2.2. Клеточная локализация и предполагаемые механизмы действия VEGF-R1 | 25 |
| 1.2.3. Физиологические эффекты VEGF-R1 | 29 |
| 1.2.4. Роль VEGF-R1 при опухолевом росте | 31 |
| 1.3. Заключение..... | 35 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 37 |
| 2.1. Линии клеток..... | 37 |
| 2.2. Экспрессия гена VEGF-R1 (Flt1)..... | 37 |
| 2.2.1. Обратная транскрипция (ревертирование)..... | 37 |
| 2.2.2. Полуколичественная ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)..... | 38 |
| 2.2.3. ПЦР в режиме реального времени (qPCR)..... | 39 |
| 2.3. Оценка уровня и клеточной локализации белка VEGF-R1 | 41 |
| 2.3.1. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток (ИЦХ)..... | 41 |
| 2.3.2. Непрямая реакция иммунофлуоресценции на проточном цитометре с интактными и пермеабелизованными клетками (РИФ)..... | 41 |
| 2.4. Исследование содержания VEGF-R1 в клеточном ядре..... | 42 |
| 2.4.1. Выделение клеточных ядер..... | 43 |
| 2.4.2. Цитологический анализ ядер..... | 43 |
| 2.4.3. Мечение ядер антителами..... | 44 |
| 2.4.4. Анализ ядер на проточном цитометре..... | 44 |
| 2.4.5. Вестерн-блоттинг..... | 46 |

| | |
|---|----|
| 2.5. Статистическая обработка результатов..... | 47 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ..... | 48 |
| 3.1. Экспрессия гена VEGF-R1 (Flt1)..... | 48 |
| 3.1.1. Полуколичественная ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)..... | 48 |
| 3.1.2. ПЦР в режиме реального времени (qPCR)..... | 49 |
| 3.2. Идентификация белка VEGF-R1 в опухолевых клетках человека..... | 52 |
| 3.2.1. Локализация VEGF-R1 в опухолевых и нормальных клетках..... | 52 |
| 3.2.2. Локализация VEGF-R1 в ядрах опухолевых и нормальных клеток..... | 57 |
| 3.3. Количественная оценка содержания белка VEGF-R1 в опухолевых и нормальных клетках с помощью проточной цитометрии..... | 62 |
| 3.3.1. Измерение VEGF-R1 на поверхности клеток..... | 62 |
| 3.3.2. Измерение содержания внутриклеточной фракции VEGF-R1..... | 64 |
| 3.3.3. Анализ содержания белка VEGF-R1 в ядрах клеток..... | 66 |
| 3.3.3.1. Контроль интактности и чистоты экстрагированных ядер..... | 66 |
| 3.3.3.2. Количественная оценка содержания VEGF-R1 в ядрах..... | 70 |
| 3.3.4. Определение белка VEGF-R1 методом вестерн-блоттинга..... | 73 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 76 |
| ВЫВОДЫ..... | 84 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... | 85 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 86 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы

В борьбе с онкозаболеваниями наука ищет всё новые точки приложения. Последние 40 лет активно разрабатывается стратегия угнетения злокачественного роста путём подавления собственного кровоснабжения неоплазмы, что лишает опухоль питательных веществ и кислорода. На роль главной мишени для такого воздействия совершенно справедливо был выбран VEGF-A (фактор роста эндотелия сосудов типа А) – ключевой лиганд, индуцирующий процесс ангиогенеза. В результате многочисленных исследований на основе гуманизированных моноклональных антител был создан таргетный антиангиогенный препарат Бевацизумаб – блокатор VEGF-A. Сначала казалось, что он способен полностью ингибировать формирование кровеносных сосудов опухоли [93,97]. Однако его клиническое применение в должной мере не оправдало ожиданий: наблюдались как исходная лекарственная устойчивость, так и развитие резистентности к препарату в процессе терапии, а также целый спектр побочных эффектов [47,51,64,120]. Недостаточная эффективность Бевацизумаба, возможно, явилась следствием его ограниченного влияния на сложную регуляторную систему VEGF/VEGF-рецепторы: ингибирование одного сигнального пути не исключало активации других, что приводило к возобновлению опухолевого ангиогенеза за счёт альтернативных механизмов. Кроме того, в последнее время рассматривается гипотеза, что в неоплазме отдельные звенья VEGF/VEGF-R-системы не опосредуют формирование кровеносных сосудов, а оказывают не связанное с ангиогенезом антиапоптотическое действие и усиливают способность опухолевых клеток к миграции, инвазии и метастазированию.

В этом плане особый интерес вызывает рецептор фактора роста эндотелия сосудов 1 типа (VEGF-R1). Это негативный регулятор ангиогенеза, сдерживающий избыточное формирование кровеносных сосудов. Такая функция VEGF-R1, крайне важная в период эмбрионального развития, экспериментально

доказана и обусловлена структурными особенностями рецептора – его низкой тирозинкиназной активностью, а также наличием растворимых изоформ (sVEGF-R1), конкурентно связывающихся с лигандом VEGF-A, но не способных к трансдукции сигнала. По этой причине первоначально VEGF-R1 рассматривали лишь в качестве антиангиогенного регулятора, не уделяя должного внимания другим функциям этого рецептора.

И только сравнительно недавно взгляд на функцию VEGF-R1 лишь в качестве супрессора ангиогенеза стал меняться. После того как экспрессия рецептора была обнаружена во многих злокачественных клетках, но при этом, за редким исключением, не отмечалась в нормальных, исследователи задумались о наличии у VEGF-R1 «неангиогенных» биологических свойств, важных для роста и прогрессии опухолей. Впоследствии это предположение нашло и своё экспериментальное подтверждение. На моделях *in vitro* было обнаружено, что активация рецептора сопровождалась усилением таких фенотипических проявлений злокачественности, как миграция, инвазия, метастазирование [49,95,127]; а Т.-Н. Lee et al. показали и антиапоптотический эффект VEGF-R1 [81].

Но, несмотря на первые полученные сведения о возможном вкладе рецептора 1 типа в канцерогенез, результаты современных исследований о его механизмах действия и биологических функциях в опухолевой клетке малочисленны и крайне противоречивы. Так, до сих пор продолжаются дискуссии о клеточной локализации VEGF-R1. Одни авторы сообщают о мембранном расположении рецептора, другие утверждают, что VEGF-R1 находится внутри клетки, что указывает на интракринный механизм стимуляции рецептора лигандом.

О внутриклеточной локализации VEGF-R1, в частности, свидетельствуют данные работы Bhattacharya et al. [25], полученные в ходе анализа биохимических интермедиатов сигнальных каскадов. В других исследованиях [19,81] установлено присутствие рецептора даже в ядрах неопластических клеток. Косвенно это указывает на возможность активации экспрессии генов, опосредованной VEGF-

R1, и, следовательно, на значимость такой функции рецептора для онкогенеза. Однако на сегодняшний день разрозненные сведения о VEGF-R1 не позволяют однозначно решить, является ли внутриклеточная и ядерная локализация рецептора его отличительной чертой, характерной для злокачественных клеток взрослого организма.

В свете вышеизложенного оправдано дальнейшее изучение VEGF-R1 – прояснение его клеточной локализации, механизмов действия и роли в неопластическом росте и прогрессии. В будущем это даст возможность подобрать адекватные способы ингибирования активности рецептора с учетом его дифференциальной экспрессии в нормальных и опухолевых клетках, а также охарактеризовать VEGF-R1 как потенциальную мишень для молекулярно-направленной терапии новообразований.

Цели и задачи исследования

Цель настоящего исследования - изучение экспрессии белка VEGF-R1 и его содержания в различных компартментах опухолевых и нормальных клеток человека.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- 1) оценить экспрессию гена VEGF-R1 в опухолевых клетках человека различного гистогенеза;
- 2) установить соотношение изоформ рецептора – мембранно-связанной и растворимой;
- 3) выявить белок VEGF-R1 и определить его локализацию в злокачественных и нормальных клетках человека при помощи ИЦХ;
- 4) разработать метод изоляции интактных клеточных ядер для измерения в них содержания рецептора;
- 5) с помощью проточной цитометрии количественно оценить уровень VEGF-R1 в различных компартментах опухолевых и нормальных клеток человека – на наружной мембране, в цитоплазме и ядре.

Научная новизна

1) Установлена экспрессия гена VEGF-R1 в ранее не исследованных в этом отношении линиях опухолевых клеток человека - BRO (низкодифференцированная высокозлокачественная меланома), A431 (карцинома вульвы).

2) Модифицирован протокол ИЦХ-окрашивания клеток для прицельного выявления интересующего белка в ядре. С его помощью показано присутствие VEGF-R1 в ядрах исключительно неопластических клеток.

3) Впервые проведена количественная оценка распределения VEGF-R1 по компартментам нормальных и опухолевых клеток человека - наружная мембрана, цитоплазма, ядро.

4) Разработан метод экстракции чистой фракции нативных клеточных ядер, пригодных для анализа на проточном цитометре, что дало возможность измерить уровень VEGF-R1 в ядрах нормальных и злокачественных клеток.

5) Проведён анализ распределения изоформ VEGF-R1 между ядром и цитоплазмой. Показано, что в опухолевых клетках полноразмерная изоформа рецептора mVEGF-R1 выявлена исключительно в ядре и не определяется в цитоплазме, а в нормальных клетках, наоборот, зарегистрирована только в цитоплазме и отсутствует в ядре.

Теоретическая значимость работы

1) В работе измерено содержание VEGF-R1 на наружной мембране, в цитоплазме и ядре нормальных и опухолевых клеток человека. Показано, что на цитоплазматической мембране и злокачественных, и нормальных клеток рецептор практически не представлен, а расположен внутриклеточно. При этом в опухолевых клетках VEGF-R1 детектировался также и в ядрах, а его суммарный внутриклеточный уровень был выше, чем в нормальных, примерно в 2,5-3 раза. Эти данные указывают на интракринный путь стимуляции рецептора лигандом. Кроме того, они свидетельствуют о значимости для злокачественной клетки ядерного VEGF-R1. Полученные результаты расширяют имеющиеся

фундаментальные знания о механизмах действия рецептора, его функциях и роли в опухолевом росте и прогрессии, а также могут быть полезны для определения действенных методов подавления активности VEGF-R1.

2) Учитывая выявленную ядерную локализацию рецептора в злокачественных клетках, предложен новый способ его ингибирования - «перепрограммирование» сплайсинга VEGF-R1 с целью увеличения выхода растворимых изоформ. Теоретически такой способ позволит добиться двойного эффекта. С одной стороны, антиангиогенного за счёт повышения концентрации растворимых изоформ VEGF-R1 в опухоли, а с другой, - непосредственно противоопухолевого из-за усилившейся клеточной гибели при подавлении полноразмерного рецептора.

Практическая значимость работы

1) Разработан метод изоляции нативных, очищенных от примесей цитоплазмы клеточных ядер, пригодных для анализа на проточном цитометре. Данный метод позволяет с высокой точностью проводить количественную оценку уровня ядерных белков, что важно как для фундаментальных исследований, так и в диагностических целях в практической медицине.

2) Установлена экспрессия белка VEGF-R1 в ядрах исключительно опухолевых, но не нормальных, клеток, причём наибольшее содержание ядерного рецептора отмечено в высокозлокачественных клетках меланомы человека B70. Поэтому наличие и уровень VEGF-R1 в ядре предлагается рассматривать в качестве предиктора неопластической трансформации.

3) Значительно более высокая экспрессия VEGF-R1 в злокачественных клетках по сравнению с нормальными, а также присутствие рецептора в ядрах исключительно опухолевых клеток указывают на потенциальную возможность использования VEGF-R1 в качестве перспективной молекулярной мишени для таргетной терапии новообразований.

Методология и методы исследования

В работе применяли комплекс современных методов исследования: цитологических, биохимических, иммунологических и молекулярно-генетических. Экспрессию гена VEGF-R1 оценивали при помощи полуколичественной ОТ-ПЦР и ПЦР в режиме реального времени. Для выявления белка рецептора и определения его клеточной локализации использовали иммуоцитохимическое окрашивание. Количественную оценку содержания VEGF-R1 в различных клеточных компартментах (наружная мембрана, цитоплазма, ядро) проводили с помощью непрямой реакции иммуофлуоресценции на проточном цитометре. Соотношение изоформ рецептора и их распределение между ядром и цитоплазмой анализировали методом вестерн-блот-анализа.

Кроме того, в настоящей работе описаны впервые применённые нами способы регистрации белков в ядре клетки:

а) модифицированный протокол ИЦХ, позволяющий элиминировать цитозольный пул рецептора и благодаря этому детектировать его ядерную локализацию;

б) метод экстракции чистой фракции интактных клеточных ядер, пригодных для измерения содержания ядерных белков на проточном цитометре.

Положения, выносимые на защиту

1) VEGF-R1 экспрессируется как опухолевыми, так и нормальными клетками, однако содержание рецептора в исследованных злокачественных линиях в среднем в 2,5-3 раза превышает его уровень в нормальных.

2) VEGF-R1 локализован преимущественно внутриклеточно, что указывает на интракринный механизм его стимуляции лигандом. Исходя из этого, эффективными способами подавления активности рецептора должны быть подходы, воздействующие на весь пул VEGF-R1, а не только его поверхностную часть. То есть препараты на основе моноклональных антител к рецептору, скорее всего, не принесут желаемого эффекта.

3) VEGF-R1 обнаружен в ядрах исключительно опухолевых, но не нормальных, клеток, а наибольшее содержание рецептора зафиксировано в наиболее злокачественной клеточной линии. Таким образом, наличие и уровень VEGF-R1 в клеточном ядре предложено рассматривать в качестве маркера неопластической трансформации клетки.

4) Вклад в формирование злокачественного фенотипа вносит полноразмерная изоформа VEGF-R1, локализованная в ядре клетки.

5) В отличие от опухолевых, в нормальных клетках отмечено низкое содержание рецептора и его практически полное отсутствие в ядрах. Данный факт даёт основание предполагать, что в нормальных клетках VEGF-R1 не играет такой важной роли, как в злокачественных. Отсюда следует потенциальная возможность использования рецептора в качестве мишени для таргетной терапии новообразований.

Степень достоверности и апробация результатов

Достаточный объём материала и стандартизированные условия постановки экспериментов, а также применение современных методов исследования и статистической обработки данных позволило получить достоверные результаты.

Результаты представленного исследования доложены и обсуждены на XIII и XV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 2016 и 2018 гг.).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Система VEGF/VEGF-R

Ангиогенез – формирование кровеносных сосудов *de novo* - играет первостепенную роль в жизнедеятельности организма, а любые сбои в его регуляции приводят к тяжёлым последствиям. Так, в злокачественном новообразовании баланс про- и антиангиогенных факторов значительно сдвинут в сторону первых. Это даёт возможность неоплазме создать собственную капиллярную сеть, что является необходимым условием её дальнейшего роста (рис.1) [3,8,10,11,14,52,56].

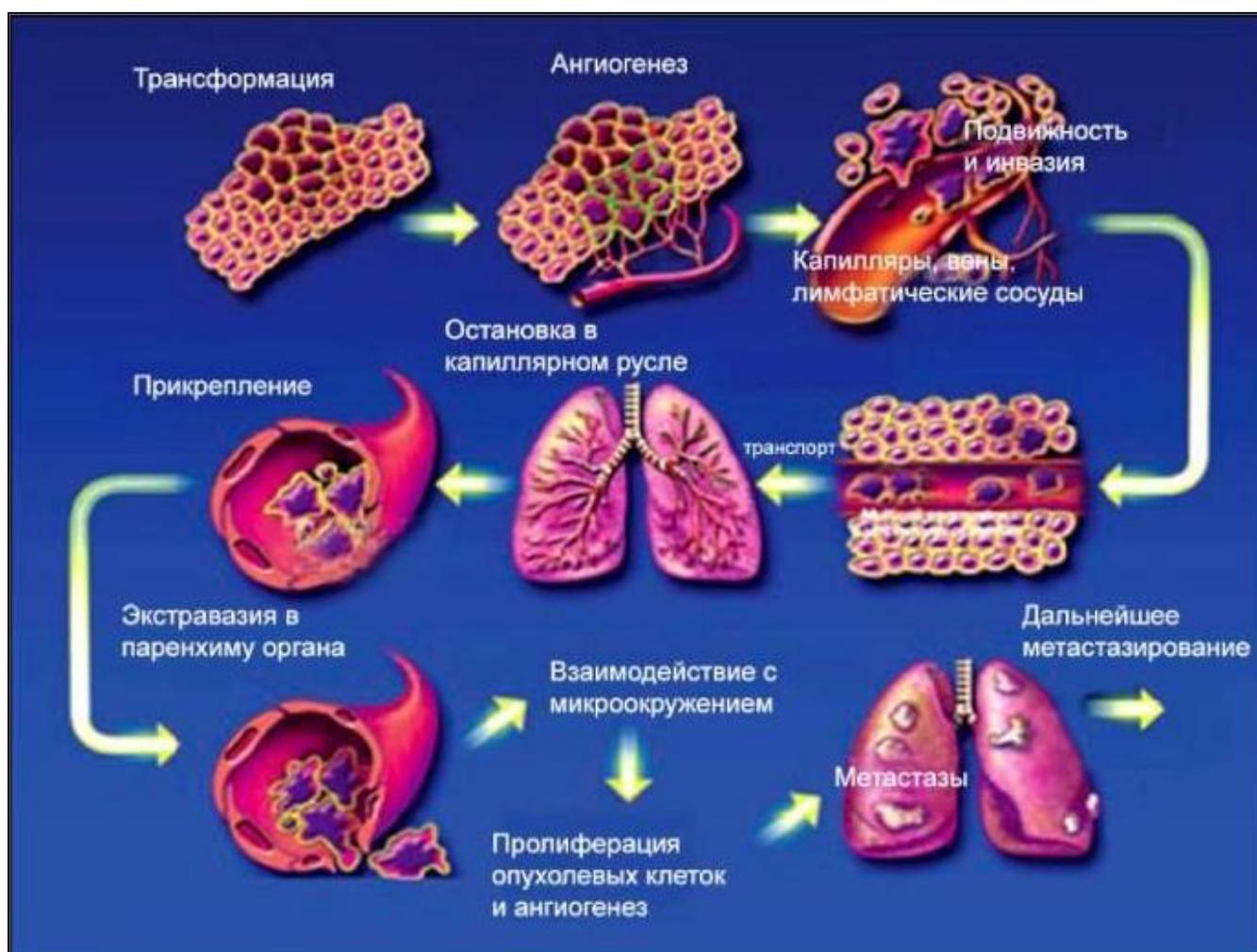


Рисунок 1 – Роль ангиогенеза в опухолевом росте и прогрессии.

Ключевую роль в регуляции опухолевого ангиогенеза играет система VEGF/VEGF-R. Она состоит из целого семейства лигандов, рецепторов, а также

их изоформ. Причём взаимодействие различных компонентов данной системы между собой может приводить как к про-, так и антиангиогенным эффектам. Кроме того, как выяснилось позднее, некоторые её участники опосредуют опухолевую прогрессию за счёт механизмов, не связанных с ангиогенезом. Особый интерес в этом плане представляет рецептор 1 типа (VEGF-R1). Он экспрессируется многими опухолевыми клетками и, как предполагают, может вносить весомый вклад в их выживание, инвазию и метастазирование.

Среди всех известных лигандов и рецепторов регуляторной системы VEGF/VEGF-R на сегодняшний день наиболее полно изучены VEGF-A и VEGF-R2. Именно их взаимодействие играет центральную роль в развитии и поддержании сосудистой сети неоплазмы. Другие компоненты системы VEGF/VEGF-R исследованы гораздо слабее, но, как показывает пример VEGF-R1, вероятно, не менее значимы для роста и прогрессии опухоли.

1.1.1. VEGF - фактор роста эндотелия сосудов

В 1983 году группой исследователей во главе с Senger из асцитической жидкости морских свинок с привитой гепатокарциномой был выделен белок массой 24-42 кДа, который значительно повышал транссудацию жидкости в брюшную полость и способствовал появлению асцита. В этой связи данный протеин получил название фактора сосудистой проницаемости (vascular permeability factor, VPF) [100]. Позднее, в 1989 году, Ferrara et al. обнаружили у этого белка выраженную митогенную активность в отношении эндотелиальных клеток коры надпочечников и предложили другое наименование – фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [50]. Полученные сведения натолкнули на мысль о ключевой роли данного белка в опухолевом ангиогенезе, что вызвало бурный всплеск его изучения.

Впоследствии были обнаружены и другие члены семейства VEGF. На сегодняшний день оно насчитывает не менее 5 различных типов белков (VEGF-A, -B, -C, -D, -E) (табл.1), кодируемых отдельными генами и отличающихся по спектру выполняемых функций. Кроме того, к этому семейству относят и

плацентарный фактор роста (PlGF), также взаимодействующий с рецепторами VEGF-R.

Таблица 1 - Семейство белков VEGF.

| Представитель семейства белков VEGF | Функция |
|--|---|
| VEGF-A | Эмбриональный ангиогенез. Вазодилатация. Хемотаксис гранулоцитов, макрофагов. |
| VEGF-B | Васкуляризация миокарда. Нейропротекция |
| VEGF-C | Лимфангиогенез |
| VEGF-D | Формирование лимфатической системы лёгких |
| VEGF-E (вирусный) | Ангиогенез |
| PlGF (плацентарный фактор роста) | Эмбриональный ангиогенез. Формирование капилляров при воспалении и регенерации тканей |

Наиболее изученным среди данных белков остаётся VEGF-A, в связи с его выраженной проангиогенной активностью. Это гомодимерный высокогликозилированный белок, экспрессирующийся в эндотелиоцитах, фибробластах, эпителиальных, а также большинстве неопластических клеток. Синтез его запускается под действием различных сигнальных факторов (HIF-1, EGF, PDGF, FGF, IL-1b) и условий окружающей среды [43,80]. Так, при гипоксии вырабатывается гипоксия-индуцированный фактор HIF-1. Он индуцирует экспрессию генов, отвечающих за выживание клеток в условиях кислородного голодания, и в их числе фактора роста эндотелия сосудов [45,86] (рис.2).

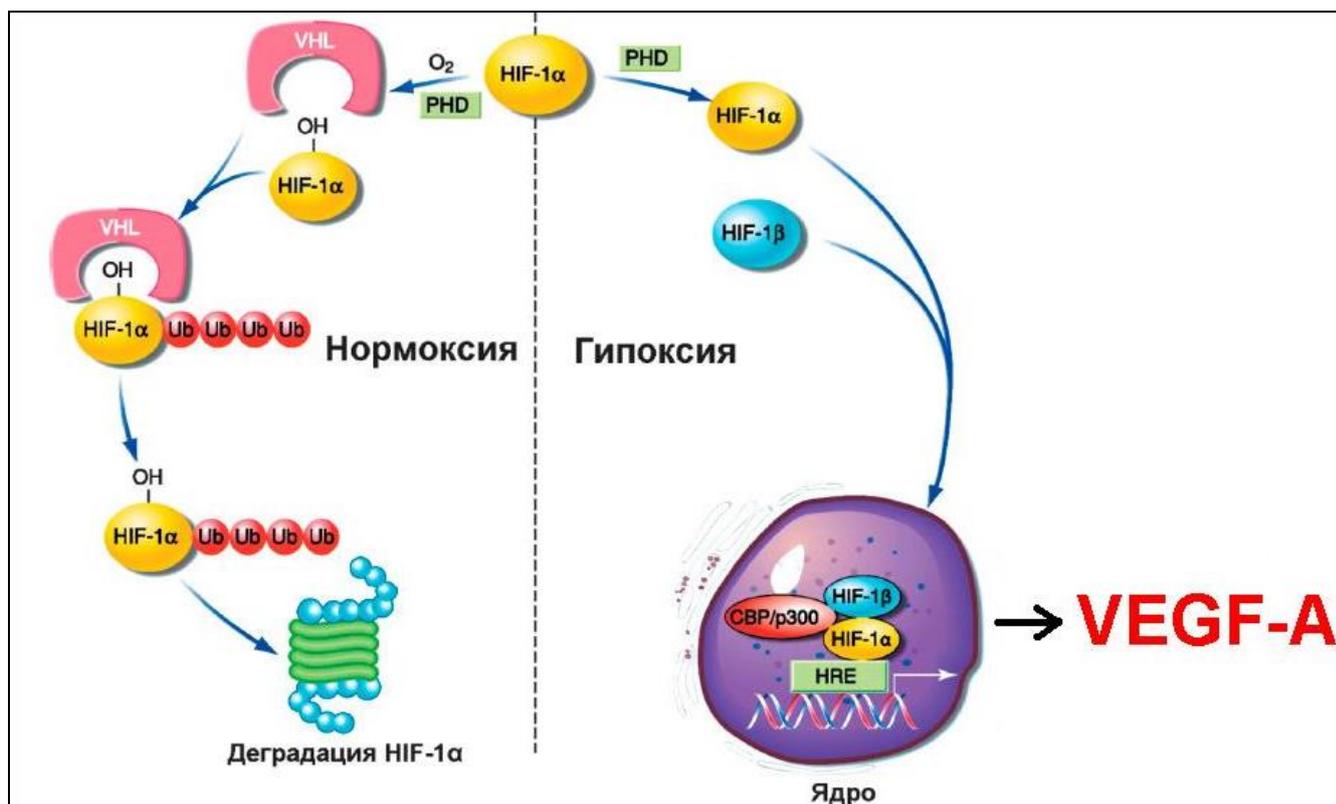


Рисунок 2 – Образование VEGF-A под действием гипоксия-индуцированного фактора HIF-1α. При кислородном голодании HIF-1α не разрушается в протеасоме, а проникает в ядро клетки, где активирует экспрессию ряда генов, в том числе и VEGF-A.

Ген VEGF-A состоит из 8 экзонов. Каждый из них кодирует аминокислотную последовательность, отвечающую за определённую функцию протеина. Экзоны 3 и 4 обеспечивают лиганд-рецепторное взаимодействие, а продукты экзонов 6a, 6b и 7 обеспечивают связывание VEGF-A с гепарином и его фиксацию во внеклеточном матриксе [118] (рис.3).

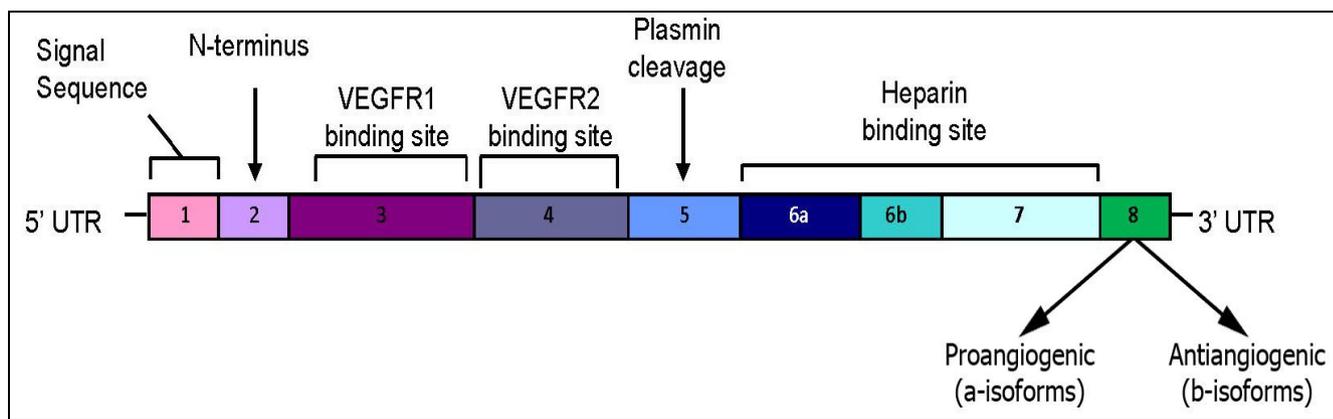


Рисунок 3 - Структура мРНК VEGF-A с указанием функционального значения экзонов. Точка терминации трансляции на 8-м экзоне определяет либо про-, либо антиангиогенные свойства VEGF-A. (По Fearnley G. W. 2013)

При альтернативном сплайсинге мРНК VEGF-A у человека образуются различные изоформы белка, классифицируемые по количеству аминокислот ($VEGF_{121}$, $VEGF_{145}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{189}$, $VEGF_{206}$). Кроме того, в зависимости от сайта разрезания 8, терминального, экзона выделяют проангиогенные а-формы (проксимальный сайт сплайсинга) и антиангиогенные b-формы (дистальный сайт) протеина, связывающиеся с рецептором примерно с одинаковой аффинностью [31].

Эффект VEGF-A определяется типом рецептора, с которым он взаимодействует. В общем случае активируются сигнальные пути, ответственные за пролиферацию и миграцию клеток. Самый мощный эффект VEGF-A реализуется в эндотелиоцитах, однако его митогенное действие проявляется и в отношении других типов клеток, как нормальных (фибробласты, эпителиальные клетки [79,122]), так и опухолевых (колоректальный рак, глиобластома [129,133]).

Спектр физиологических функций VEGF-A чрезвычайно разнообразен. Во время эмбрионального развития он стимулирует пролиферацию и миграцию эндотелиоцитов с образованием незрелых кровеносных сосудов. В дальнейшем VEGF-A способствует выживанию эндотелиальных клеток, ингибируя апоптоз, что в конечном счете приводит к «дозреванию» капилляров. Во взрослом организме он участвует в хемотаксисе гранулоцитов и макрофагов, регулирует проницаемость сосудистой стенки, а также обладает ангиопротективным

эффектом. Значение данного белка для организма столь велико, что повреждение даже одной аллели гена VEGF-A приводит к внутриутробной гибели эмбриона [29].

VEGF-A играет важную роль и в развитии различных заболеваний. Его избыточная экспрессия вызывает диабетическую ретинопатию, псориаз, ревматоидный артрит, а сниженная – язвенную болезнь желудка и остеопороз [1,2,9,30]. Практически при всех злокачественных новообразованиях наблюдается высокий уровень VEGF-A, поскольку его продукция осуществляется самими трансформированными клетками [4,6,15,16]. На это, в частности, указывает факт образования сосудов в перевиваемой опухоли человека независимо от того, имплантирована она в участок ткани животного с высокой или низкой степенью васкуляризации [65].

VEGF-A критически значим для выживания и прогрессии неоплазмы благодаря следующим функциям:

- 1) стимулирует опухолевый ангиогенез, что ускоряет метаболические процессы и, как следствие, повышает митотический потенциал злокачественных клеток;
- 2) способствует выживанию неопластических клеток путём подавления апоптоза;
- 3) способен напрямую стимулировать пролиферацию опухолевых клеток;
- 4) увеличивает вероятность метастазирования, индуцируя экспрессию матриксных металлопротеиназ MMP-9 [37,134];
- 5) подавляет иммунный ответ хозяина, нарушая созревание антигенпрезентирующих клеток (дендритные, макрофаги) [102];
- 6) повышает проницаемость сосудов, что способствует накоплению в неоплазме питательных веществ и образованию «маскировочного» фибринового слоя, обеспечивающего иммунное ускользание.

Данные о важной роли VEGF-A в злокачественном росте и прогрессии обосновывают использования этого лиганда в качестве мишени для таргетной противоопухолевой терапии. Так, Бевацизумаб (Авастин) - моноклональное

антитело, специфически связывающее VEGF-A, - действительно показал свою эффективность при лечении ряда онкологических заболеваний - метастатического колоректального рака, глиобластомы, карциномы яичников и маточной трубы, мезотелиомы плевры [20,21,34,78]. Однако у него были выявлены и существенные недостатки, среди которых можно выделить исходную нечувствительность к действию препарата, развитие резистентности к нему, а также целый спектр зачастую тяжёлых побочных эффектов [47,51,64,120]. Вероятно, эти нежелательные реакции обусловлены тем, что при отсутствии VEGF-A опухоль может успешно формировать сосудистую сеть за счет альтернативных путей, в которых принимают участие другие лиганды, что подтверждает всю сложность регуляции многоступенчатой системы VEGF/VEGF-рецепторы. К тому же VEGF-A играет важную роль и в физиологии нормальных клеток, поэтому неудивительно, что подавление его активности сопряжено с массой побочных эффектов.

Другой представитель семейства – VEGF-B - структурно схож с VEGF-A, но, в отличие от последнего, вносит слабый вклад в ангиогенез и не оказывает никакого влияния на проницаемость сосудов. Показано, что VEGF-B-дефицитные мыши здоровы, фертильны и обладают нормально развитой кровеносной системой [17]. Ангиогенная роль данного белка в норме продемонстрирована лишь при формировании сосудистой сети миокарда [24]. Однако VEGF-B активно синтезируется в нервной ткани, где оказывает мощное нейропротективное действие. По данным Li Y. et al. [82], он предотвращает апоптоз нейронов при ишемии, травме, обработке пероксидом водорода, подавляя экспрессию важнейших проапоптотических генов при взаимодействии со своим специфическим рецептором VEGF-R1.

Также VEGF-B выявлен и в некоторых типах опухолевых клеток, например, при немелкоклеточном раке лёгкого и нейробластоме, где он, скорее всего, также оказывает мощный антиапоптотический эффект [46,85].

Определены роли и других лигандов семейства VEGF: -C, -D и PlGF. VEGF-C стимулирует образование лимфатических капилляров во время

внутриутробного развития и практически не принимает участия в ангиогенезе [77]. VEGF-D также отвечает за эмбриональный лимфангиогенез, однако, как полагают, активен исключительно в лёгочной ткани. PlGF опосредует формирование фетоплацентарного комплекса, а его недостаток может привести к прерыванию беременности вследствие недостаточного кровоснабжения плода [33,96].

Биологическое действие лиганда напрямую зависит от типа рецептора, с которым он связывается. Один и тот же представитель семейства VEGF, присоединяясь к различным рецепторам VEGF-R, может вызывать прямо противоположный эффект, что предопределяет взаимосвязанный подход при изучении того или иного члена VEGF/VEGF-R-системы.

1.1.2. Общая характеристика VEGF-рецепторов (VEGF-R)

В настоящее время известно 3 типа рецепторов VEGF-R. Первым из них, в 1990 году, был открыт VEGF-R1 (Flt1) [104]. Двумя годами позднее идентифицировали второй вид рецептора – VEGF-R2 (KDR) [114], а затем и рецептор 3 типа – VEGF-R3 [58].

Все эти белки являются гомодимерными трансмембранными тирозинкиназами, имеют сходный общий план строения и состоят из 3 участков: внеклеточного, трансмембранного и внутриклеточного. Первый содержит 7 иммуноглобулиноподобных доменов и опосредует лиганд-рецепторное связывание. Трансмембранная область насыщена гидрофобными аминокислотами и позволяет рецептору удерживаться на биологических мембранах. Внутриклеточная часть обладает тирозинкиназной активностью и отвечает за передачу сигнала. Он включает 2 каталитических домена, разделённых специфичной для каждого рецептора интеркиназной вставкой (рис.4) [107].

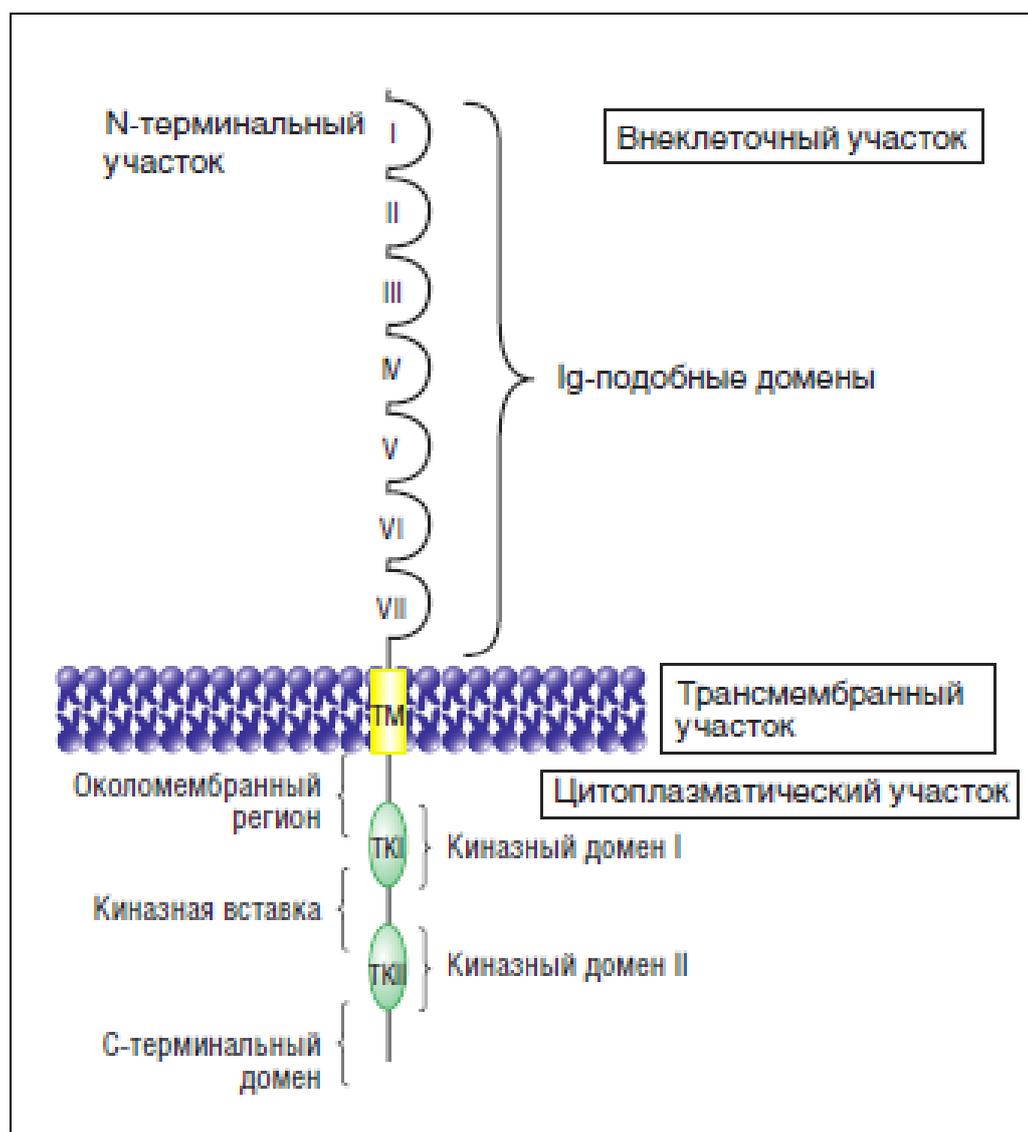


Рисунок 4 – Структурная организация рецепторов семейства VEGF-R. ТМ – трансмембранный домен; ТК I и ТК II – первый и второй тирозинкиназные домены.

Различные VEGF-лиганды связываются с определёнными рецепторами с неодинаковой аффинностью. VEGF-A взаимодействует с VEGF-R1 и -R2, но практически не присоединяется к VEGF-R3; VEGF-C и -D не связываются с рецептором 1 типа [103]. Для последнего специфическими лигандами служат VEGF-B и PlGF (рис.5).

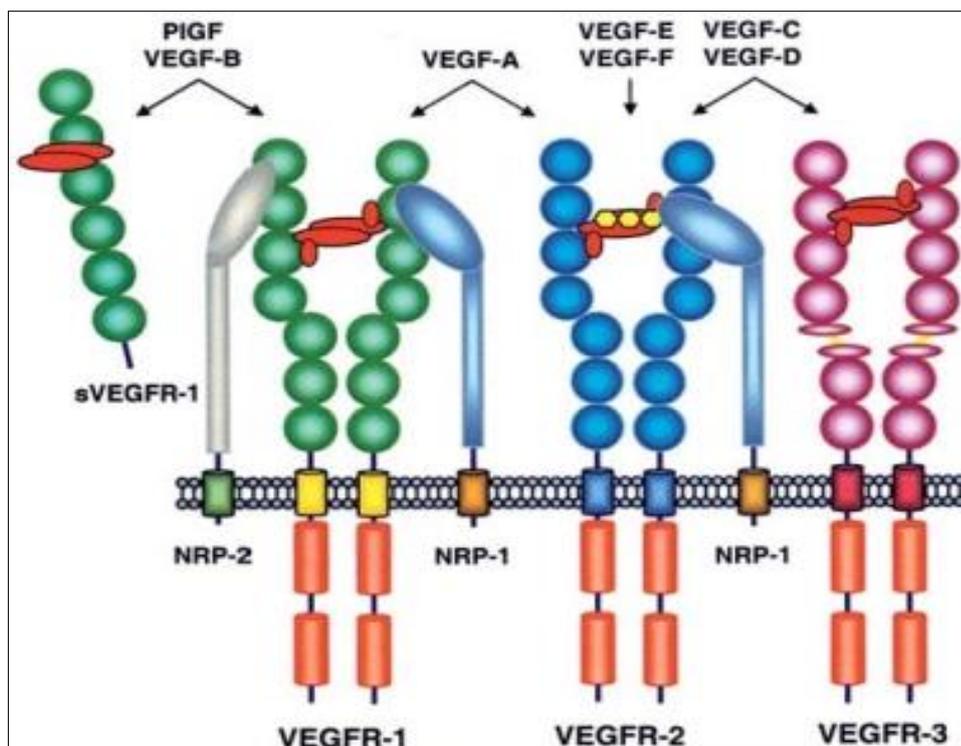


Рисунок 5 - Взаимодействие факторов роста семейства VEGF со своими рецепторами. VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; VEGF-R – рецептор фактора роста эндотелия сосудов; sVEGF-R1 – растворимая изоформа рецептора фактора роста эндотелия сосудов 1 типа; PIGF – плацентарный фактор роста; NRP-1/2 – нейропилин 1 или 2 типа соответственно.

Экспрессия VEGF-R1 выявлена в эндотелиоцитах, моноцитах, макрофагах, нейронах и, как позднее выяснилось, различных опухолевых клетках. Рецептор 2 типа представлен в эндотелиальных, стволовых гемопоэтических клетках, кардиомиоцитах и мегакариоцитах [66]. VEGF-R3 присутствует практически только на клетках эндотелия лимфатических капилляров [121].

Механизм действия всех VEGF-R схож. После связывания с лигандом происходит димеризация рецептора с дальнейшим межмолекулярным трансфосфорилированием, что запускает различные внутриклеточные биохимические каскады [39,55,111]. В частности, активируются Ras- и PI3K/Akt/mTORC1-пути, в результате чего усиливается биосинтез белка, пролиферация и выживание эффекторных клеток. Кроме того, вследствие стимуляции протеинкиназы C происходит увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , играющего важнейшую роль в процессах перестройки

цитоскелета. Также за счёт повышения активности фосфолипазы A2 в клетке синтезируются различные биологические медиаторы (простагландины, NO), влияющие на проницаемость сосудистой стенки и формирование просвета капилляров. Причём в зависимости от типа рецептора, с которым связывается VEGF-лиганд, происходит активация тех или иных внутриклеточных сигнальных путей, что приводит к различным биологическим эффектам такого взаимодействия (рис.6).

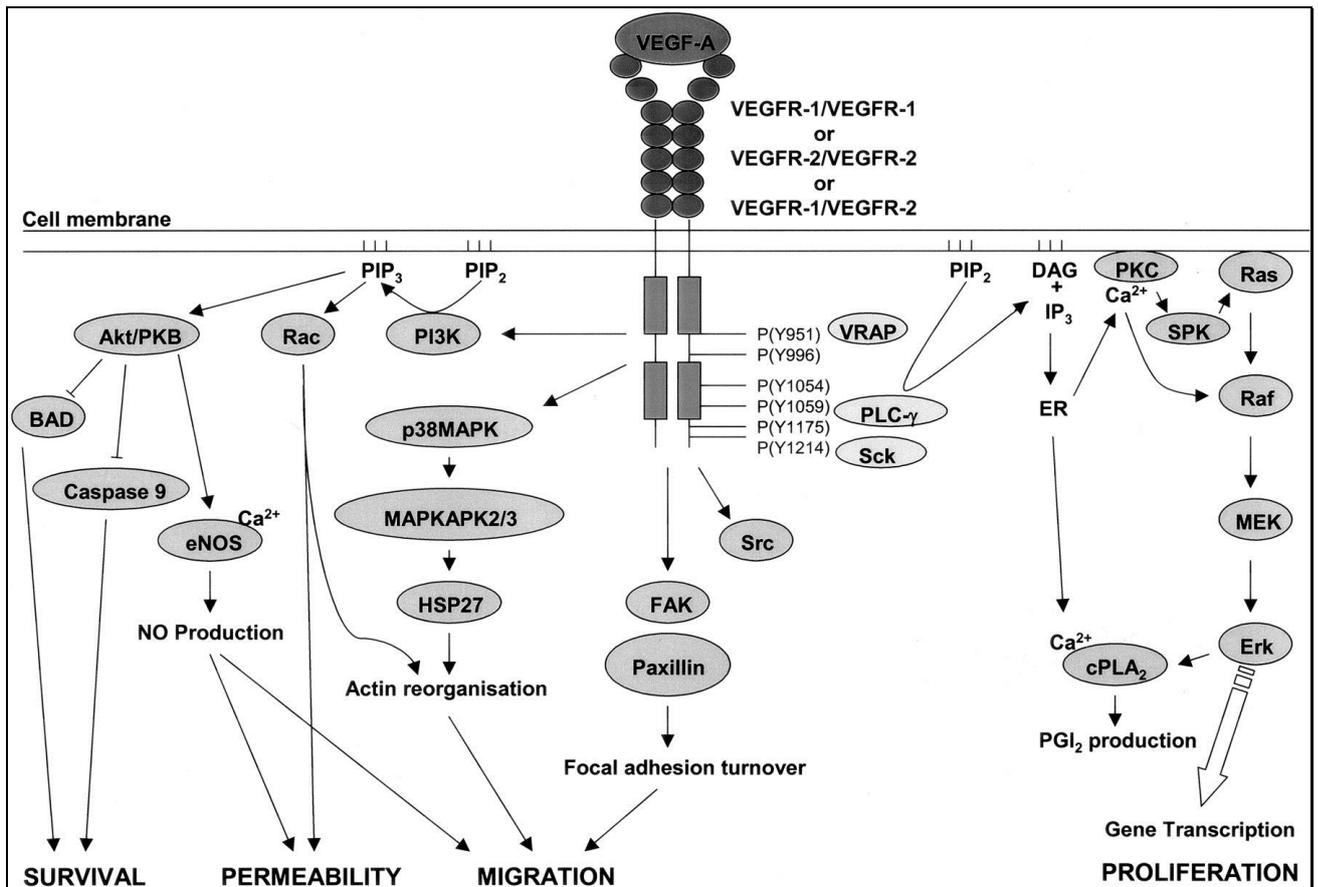


Рисунок 6 - Активация сигнальных путей в результате взаимодействия VEGF со специфическими рецепторами. Ras-сигналинг (справа) индуцирует пролиферацию эндотелиоцитов, а PI3K/Akt-путь (слева) - их выживание и проницаемость сосудов. (Hoeben A. 2004)

Кроме вышеописанных белков, к семейству VEGF-рецепторов относят и нейропилины (NP), которые также способны связываться с VEGF, хотя и не столь специфично, как VEGF-R. На сегодняшний день выявлено 2 типа нейропилинов - NP-1 и NP-2. Спектр их экспрессии достаточно широк: они представлены в

нервной системе, сердце, плаценте, печени, почках, лёгких, скелетных мышцах, а также клетках эндотелия [7]. Считают, что NP1 служит ко-рецептором для VEGF-R2 [54], модулируя его взаимодействие с лигандом, а NP2 вносит ощутимый вклад в лимфангиогенез за счёт связывания с VEGF-C [130]. Однако точные механизмы действия нейропилинов на сегодняшний день не определены.

Более того, в настоящее время до конца не установлены функции и самих VEGF-рецепторов. Различные VEGF-R, при всей схожести строения и передачи сигнала, характеризуются неодинаковым сродством к лиганду и каталитическим потенциалом. VEGF-R1 имеет самую высокую аффинность к VEGF-A ($K_d = 15-100$ pM против $K_d = 400-800$ pM для VEGF-R2 [115]). Однако, по сравнению с VEGF-R2, его каталитическая активность значительно меньше вследствие наличия репрессорной области в примембранной части тирозинкиназного домена [59]. Поэтому проангиогенные эффекты VEGF-A опосредованы в основном стимуляцией VEGF-R2, а VEGF-R1, наоборот, может даже играть роль антиангиогенного рецептора-«ловушки», который конкурентно связывает лиганд и уменьшает его доступность для рецептора 2 типа [124].

В этом свете парадоксальной выглядит экспрессия VEGF-R1 в большинстве типов злокачественных клеток, притом что нормальные его практически не содержат. Ведь присутствие «антиангиогенного» рецептора 1 типа теоретически должно только снижать васкуляризацию и задерживать рост опухоли. Тогда напрашивается предположение о каком-то ином предназначении VEGF-R1 для развития неоплазмы. Возможно, роль рецептора в опухолевой клетке заключается в способности стимулировать злокачественную прогрессию за счёт механизмов, не связанных с ангиогенезом.

В последнее время именно такой взгляд на функцию VEGF-R1 всё больше находит своё экспериментальное подтверждение. Так, по мнению ряда авторов, рецептор 1 типа может вносить ощутимый вклад в выживаемость неопластических клеток, а также усиливать их инвазивный и метастатический потенциал [25,49,81,127]. Однако на сегодняшний день подобных работ немного,

а полученные данные разрозненны и противоречивы, поэтому данная тема требует дальнейших исследований.

1.2. Рецептор фактора роста эндотелия сосудов 1 типа (VEGF-R1)

1.2.1. Молекулярное строение VEGF-R1 и его изоформы

Важной особенностью рецептора 1 типа является существование четырёх его изоформ: одной полноразмерной мембранно-связанной (mVEGF-R1, mFlt1; молекулярная масса ~200 кДа) и трёх растворимых (sVEGF-R1, sFlt1; с молекулярными массами 80, 77 и 62 кДа), образующихся в результате альтернативного сплайсинга. Все изоформы кодируются одним геном, мРНК которого состоит из 30 экзонов. Для формирования mVEGF-R1 необходима трансляция всех "смысловых последовательностей", в то время как различные sVEGF-R1 в зависимости от молекулярной массы кодируются только первыми 13, 14 либо 15 экзонами [67,99] (рис.7).

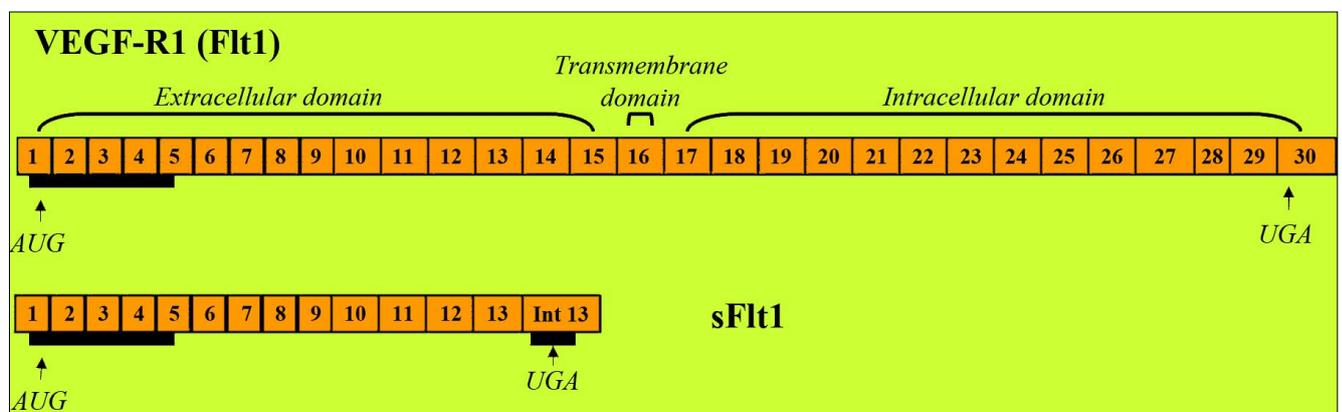


Рисунок 7 - Схема сплайсинга мРНК VEGF-R1 (Flt1). Удержание 13-го интрона со стоп-кодом UGA приводит к образованию «усечённой» растворимой изоформы VEGF-R1 массой 62 кДа (sFlt1) с выраженными антиангиогенными свойствами. (По Sela S. et al. 2008)

Точный механизм регуляции соотношения сплайсоформ не установлен. По предположению Thomas C. P. et al., ведущую роль в образовании mFlt1 может играть цис-элемент в 15 экзоне в комплексе с чувствительным к гипоксии транс-

фактором [116]. Поэтому в условиях пониженной оксигенации соотношение mVEGF-R1/sVEGF-R1 растёт, а при нормальной и повышенной концентрации кислорода - падает. Ещё одним важным параметром является концентрация лиганда: в условиях избытка VEGF мембранный рецептор способен расщепляться с образованием различных sVEGF-R1 [28].

Полноразмерная форма VEGF-R1 состоит из 3-х «классических» частей: внеклеточной, трансмембранной и цитоплазматической. Благодаря наличию киназного домена, mVEGF-R1 после связывания с VEGF активирует сигнальный биохимический каскад внутри клетки, реализуя тем самым эффекты лиганда. Помимо гомодимерных рецепторов (R1/R1), существуют и полноразмерные «химерные» формы (R1/R2). Как показали исследования, гетеродимеры образуются, если внутриклеточная концентрация субъединиц VEGF-R2 на порядок выше, чем –R1. В этой ситуации практически все протомеры рецептора 1 типа участвуют в формировании «химерного» комплекса. Показано, что по своим функциям VEGF-R1/R2 ближе к гомодимеру R1/R1, нежели к R2/R2. В частности, его тирозинкиназный потенциал значительно ниже. Кроме того, как и гомодимер R1/R1, он способен активировать NO-синтазу. Так, в экспериментах на культуре ткани изолированной аорты крысы NO-зависимая вазорелаксация была опосредована активацией рецепторов, обязательно содержащих в своём составе R1-субъединицу (то есть гомодимера R1/R1 либо гетеродимера R1/R2) [40].

Растворимые изоформы VEGF-R1 не связаны с мембраной клетки, состоят только из внеклеточной рецепторной части и содержат лишь первые 6 иммуноглобулиноподобных доменов. Установлено, что sVEGF-R1 конкурентно связываются с VEGF, но, поскольку лишены тирозинкиназного домена, не способны к передаче сигнала от лиганда. Кроме этого, растворимые изоформы ингибируют и сами полноразмерные VEGF-R1 и -R2, формируя с ними неактивные комплексы [23].

В настоящее время роль sVEGF-R1 как негативных регуляторов ангиогенеза можно считать доказанной. Клиническим подтверждением тому может служить значительное повышение концентрации растворимых изоформ в плазме крови

пациенток с преэклампсией (невынашиванием плода). Вероятно, это обусловлено связыванием sVEGF-R1 с VEGF-A и, что особенно важно, с PlGF, что нарушает формирование фетоплацентарного комплекса и в конечном итоге может привести к прерыванию беременности [73].

Таким образом, различные изоформы VEGF-R1 после связывания с лигандом разнонаправленно влияют на ангиогенез. Если антиангиогенная роль sVEGF-R1 сомнений уже не вызывает, то клеточные эффекты mVEGF-R1, особенно в опухолевых клетках, до конца не ясны.

1.2.2. Клеточная локализация и предполагаемые механизмы действия VEGF-R1

Несмотря на то что VEGF-R1 был открыт первым среди известных VEGF-рецепторов, информация о нём крайне скудна, а имеющиеся сведения разноречивы. До сих пор нет единого мнения о клеточной локализации, механизмах действия и значении рецептора для опухолевого роста.

Долгое время считали, что VEGF-R1, как представитель класса тирозинкиназных рецепторов, должен располагаться преимущественно на цитоплазматической мембране. Учитывая, что белковый лиганд не способен проникать через клеточную оболочку, он может связываться с рецептором только на её поверхности. В экспериментах *in vitro* на клетках рака толстой кишки и множественной миеломы прямым указанием на такую локализацию VEGF-R1 служил факт эффективного подавления его активности при помощи моноклональных антител [49,123]. Исходя из этого, обоснованным выглядело предположение либо об аутокринном, либо о паракринном пути активации рецептора 1 типа.

Позднее, в других работах, VEGF-R1 был идентифицирован внутри клетки [13]. Более того, Т.-Н. Lee et al. в 2007 году методом конфокальной микроскопии обнаружили его даже в ядрах клеток карциномы молочной железы. Сама по себе внутриклеточная локализация рецептора не позволяет сделать однозначного вывода о его функциональной активности, так как он может просто

депонироваться в цитоплазме и не участвовать в трансдукции сигнала. Но наличие VEGF-R1 в ядре с большой долей вероятности свидетельствует о его значимости для физиологии опухолевой клетки. В этом контексте авторы пришли к выводу об интракринной стимуляции рецептора лигандом, что противоречило ранним представлениям [81]. Таким образом, в 2007 году был предложен другой механизм действия VEGF-R1, связанный не с поверхностной, а внутриклеточной локализацией рецептора.

Дальнейшие исследования отчасти подтвердили правоту этих рассуждений. Так, неэффективность подавления VEGF-R1 тирозинкиназными ингибиторами, не способными проникать через цитоплазматическую мембрану, в клетках плоскоклеточной карциномы полости рта (HNSCC) прямо указывала на внутриклеточную локализацию рецептора [119]. Кроме того, в 2016 году, Bhattacharya R. et al. на 4-х клеточных линиях колоректального рака методом иммунокопреципитации установили, что VEGF связывается с VEGF-R1 непосредственно внутри клетки [25]. В той же работе было показано, что ингибирование или лиганда, или рецептора путём РНК-интерференции приводило к подавлению Akt- и ERK-киназных каскадов. На основании полученных результатов авторы пришли к выводу о решающем значении тирозинкиназной активности VEGF-R1 для реализации механизма передачи сигнала от VEGF.

На сегодня внутриклеточная и даже ядерная локализация установлена уже для целого ряда рецепторов-тирозинкиназ, в частности EGFR, IGF-1R, FGFR-1, HGFR, CSF-1R [18,22,60,84,106]; также описаны 2 возможных механизма транслокации этих белков в ядро - INFS (Integrative Nuclear FGFR-1 Signaling) и INTERNET (INtegral Trafficking from the ER to the Nuclear Envelope Transport) [105,126] (рис.8).

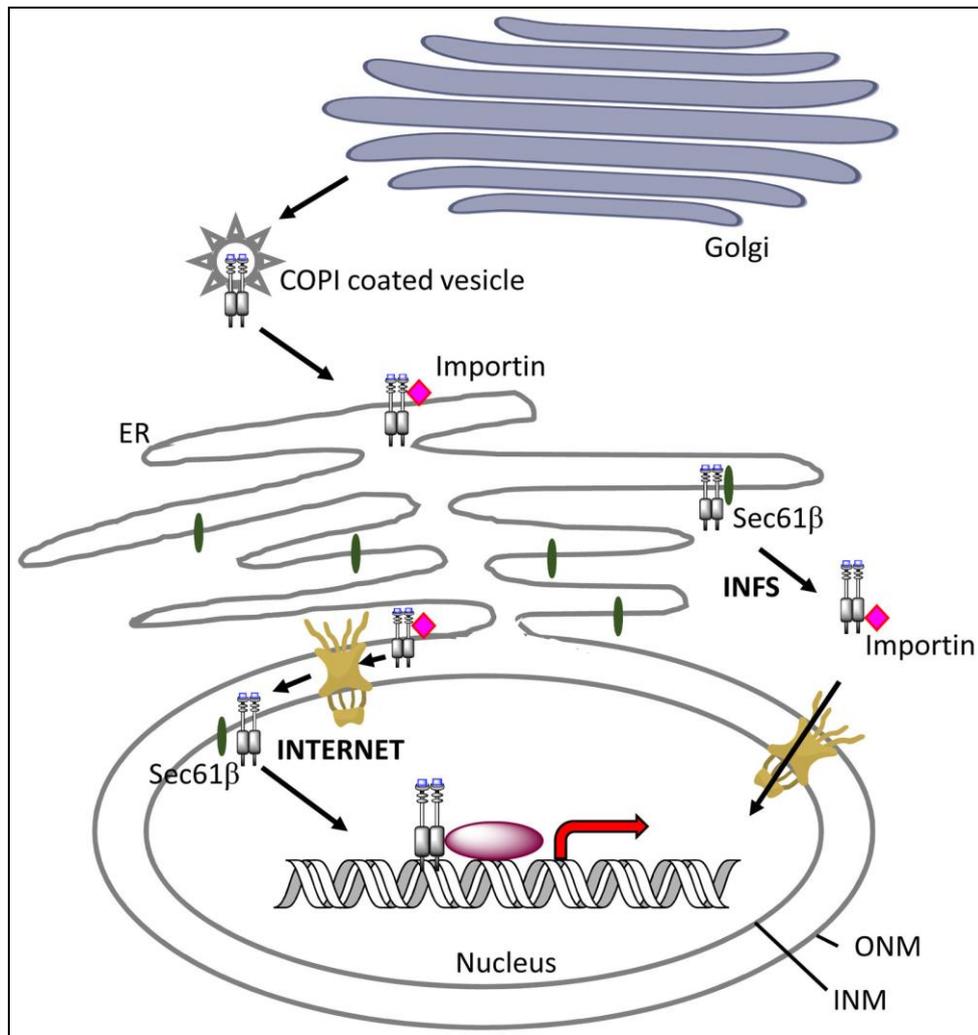


Рисунок 8 - Пути транспорта мембранно-связанных тирозинкиназных рецепторов в ядро. INFS-путь реализуется за счёт «выталкивания» рецептора из эндоплазматического ретикулума в цитоплазму через канал Sec61 β с последующим поступлением в ядро в комплексе с белком-импортином. INTERNET-путь предполагает транспорт рецептора через всю систему канальцев эндоплазматической сети и его дальнейший выброс непосредственно в ядро клетки. ONM – наружная мембрана ядра; INM - внутренняя мембрана ядра; ER – эндоплазматический ретикулум; Golgi – аппарат Гольджи. (Chen M.-K. et al. 2015)

Кроме того, в работе Chen M.-K. et al. сообщается, что данные транспортные пути используются для переноса не только полноразмерных тирозинкиназных рецепторов, но и их различных изоформ и фрагментов [36] (рис.9). Например, показано, что после связывания с лигандом на поверхности клеток рака молочной железы рецептор эпидермального фактора роста 4 (erb-B4)

под действием протеаз распадается на вне- и внутриклеточные домены (ECD и ICD соответственно). Последний в дальнейшем может попадать в ядро, где предположительно активирует транскрипцию различных генов [57,117].

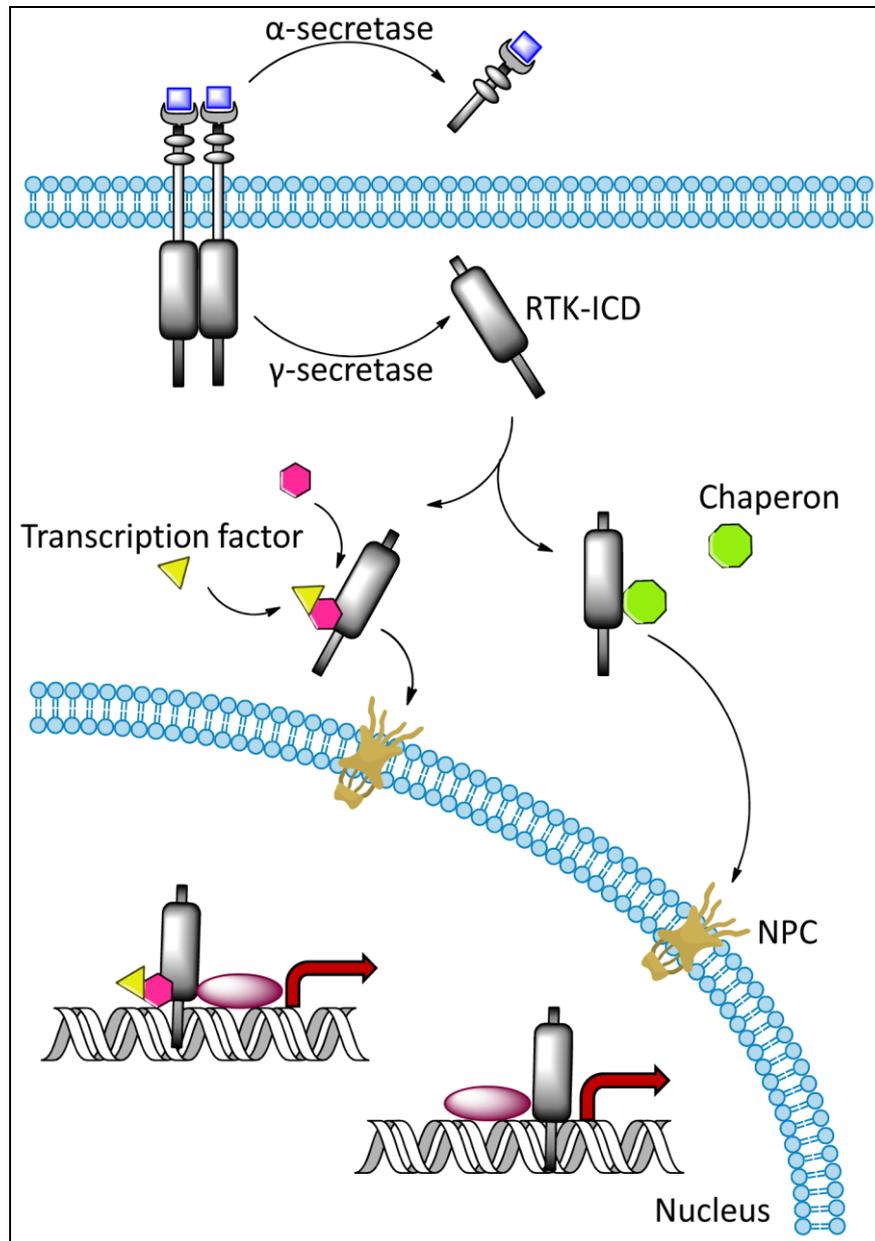


Рисунок 9 – Возможный механизм переноса фрагментов тирозинкиназных рецепторов (RTK) в ядро клетки. Внутриклеточный домен (RTK-ICD), образующийся после связывания рецептора с лигандом под действием γ -секретазы, поступает в ядро в комплексе либо с транскрипционными факторами, либо с шаперонами. В обоих случаях RTK-ICD модулирует генную экспрессию. NPC – ядерный поровый комплекс. (Chen M.-K. et al. 2015)

Возможно, VEGF-R1, будучи тирозинкиназным рецептором, реализует свой биологический эффект сходным образом: связывая лиганды на поверхности клетки или внутри неё, он либо его часть вышеописанными путями проникает в клеточное ядро, где индуцирует экспрессию определённых генов. Если это так, то для функционирования VEGF-R1 не требуется высокая каталитическая активность, так как инициация транскрипции может осуществляться за счёт белок-белковых взаимодействий с различными факторами. И хотя данная гипотеза вполне правдоподобна, своего экспериментального подтверждения она пока не нашла.

1.2.3. Физиологические эффекты VEGF-R1

По литературным данным, роль VEGF-R1 в физиологии взрослого организма не столь значительна, как у VEGF-R2. В то же время в период внутриутробного развития важность рецептора 1 типа для регуляции ангиогенеза сомнений не вызывает. Так, эмбрионы мышей с null-мутациями и по VEGF-R2, и по VEGF-R1 погибали на 9-й день гестации [53,101]. При этом если причиной гибели нокаутных по VEGF-R2 животных являлась остановка формирования сосудистой сети организма из-за отсутствия зрелых эндотелиоцитов, то мыши, лишённые рецептора 1 типа, напротив, умирали вследствие чрезмерного ангиогенеза. Но когда в VEGF-R1 "выключали" лишь тирозинкиназный домен (TK-/-), оставляя внеклеточную часть нетронутой, все животные имели практически неизменённую сосудистую сеть и выживали [68]. Вероятно, при полном подавлении рецептора 1 типа не образуются и его антиангиогенные растворимые изоформы - sVEGF-R1, - в результате чего происходит избыточное формирование кровеносных сосудов. Инактивация только тирозинкиназного домена VEGF-R1 приводит к прекращению синтеза лишь мембранно-связанного рецептора, не отменяя регуляторного действия sVEGF-R1. Исходя из полученных данных, авторы заключили, что основной функцией рецептора 1 типа во время внутриутробного развития является супрессия ангиогенеза, а каталитическая активность VEGF-R1 в принципе не играет важной роли.

Существует и другая версия, объясняющая эти результаты. По мнению Kaplan R. N. et al. [76], VEGF-R1 без каталитического домена может сохранить «остаточную» киназную активность и поэтому способен к трансдукции сигнала лиганда благодаря формированию гетеродимеров с другими тирозинкиназными рецепторами или интегринами.

Во взрослом организме ангиогенез уже не имеет столь существенного значения, так как образование новых кровеносных сосудов ограничено в основном процессами регенерации и женским репродуктивным циклом [91,112]. Важную роль VEGF-R1 играет только во время беременности, стимулируя формирование плацентарного кровообращения за счёт взаимодействия со своим специфическим лигандом PlGF [38].

У взрослых большое значение также могут иметь биологические эффекты рецептора 1 типа, не связанные с ангиогенезом. Например, активация VEGF-R1 на моноцитах и макрофагах вызывает их миграцию из сосудистого русла к очагу воспаления [88]. В последнее время появляется всё больше данных о нейропротективном действии VEGF-R1. Так, *in vitro*, на 5 линиях клеток, и *in vivo* доказано, что, связываясь со своим специфическим лигандом VEGF-B, рецептор снижает гибель нейронов за счёт ингибирования основных проапоптотических белков, в том числе каспаз -8, -9, p53, BAD и других [82]. Кроме того, на клеточной модели болезни Паркинсона было показано повышение выживаемости нервных клеток под влиянием экзогенно введённого VEGF-B [48]. Учитывая результаты вышеописанных работ, сейчас уже можно смело утверждать, что высокий уровень VEGF-R1 в нейронах объясняется его особым предназначением – спасать клетки от гибели [92,108]. Однако клеточный спектр экспрессии рецептора в норме всё-таки достаточно узок, поэтому, скорее всего, его антиапоптотический эффект в организме довольно ограничен.

Таким образом, в контексте ангиогенеза физиологическое значение VEGF-R1 состоит в ограничении избыточного формирования кровеносных сосудов во время эмбрионального развития: либо за счёт растворимых изоформ, либо конкурентного связывания с лигандом. Во взрослом организме, вероятно, более

важны «неангиогенные» эффекты рецептора. Особого внимания, несомненно, заслуживают данные об антиапоптотическом действии VEGF-R1. Очень похоже, что рецептор может выполнять такую защитную функцию и в опухолевых клетках.

1.2.4. Роль VEGF-R1 при опухолевом росте

Хотя функции рецептора 1 типа в нормальном взрослом организме ограничены, VEGF-R1 играет ведущую роль в патогенезе целого ряда заболеваний. В частности, известно, что гиперэкспрессия растворимых изоформ рецептора является центральным звеном в развитии преэклампсии. Как уже говорилось, sVEGF-R1, связываясь со своими лигандами VEGF-A и PlGF, предотвращают их взаимодействие с полноразмерными рецепторами и подавляют тем самым формирование плацентарного кровоснабжения эмбриона [32,73]. Также, по данным Gruson D. et al. [63], повышенный уровень растворимых изоформ в плазме крови ассоциирован с высоким риском сердечно-сосудистой патологии в связи с угнетением васкуляризации миокарда.

Несмотря на полученные подтверждения важного вклада VEGF-R1 в развитие ряда заболеваний, в онкологии интерес к нему долгое время оставался слабым. Это связано, главным образом, с тем, что основные участники VEGF/VEGR-R-системы изучались исключительно в рамках опухолевого ангиогенеза. В этой связи неудивительно, что «антиангиогенный» рецептор 1 типа не привлекал особого внимания.

Однако позднее, в 2000-х годах, появились работы, в которых была показана высокая экспрессия VEGF-R1 в злокачественных клетках различного гистогенеза (карцинома молочной и поджелудочной железы, рак толстой кишки и яичников, глиобластома, липосаркома, меланома человека и др. [19,25,35,49,61,74,81,109,127]). Данная информация натолкнула исследователей на мысль, что рецептор необходим для выживания опухолевой популяции. Косвенно справедливость такого предположения подтверждалась выявленной на проточном цитометре высокой экспрессией рецептора (~80%) в клетках множественной

миеломы [5]. Разумеется, для прогрессии гемобластозов нет необходимости стимулировать ангиогенез, поскольку клетки получают кислород и питательные вещества непосредственно из окружающей их среды. Поэтому VEGF-R1 в этом случае может выполнять какие-то другие, «неангиогенные», функции: повышать выживаемость миеломных клеток, защищая их от гибели, усиливать фенотипические проявления их злокачественности и др.

Впоследствии ведущая роль рецептора в прогрессировании неопластических заболеваний была доказана в экспериментах на животных. Установлено, что скорость роста опухолей, привитых трансгенным мышам с делецией по тирозинкиназному домену -R1 (VEGF-R1 TK-/-), замедлялась [69]. Кроме того, метастазирование в лёгкие перевиваемой карциномы Льюиса у таких животных оказалось значительно ниже, чем у мышей дикого типа (VEGF-R1 TK+/+) [70]. Авторы объяснили этот эффект тем, что стимуляция рецептора 1 типа способствует миграции из костного мозга в кровотоки моноцитов, которые инфильтрируют лёгкие и создают тем самым "метастатическую нишу". Посредником в этом процессе выступает металлопротеиназа MMP-9, участвующая в разложении межклеточного матрикса и формировании условий для закрепления и размножения опухолевых клеток.

В дальнейшем и в условиях *in vitro*, на 11 клеточных линиях карциномы поджелудочной железы и 2 линиях толстой кишки, был подтвержден значительный вклад рецептора 1 типа в процессы, обуславливающие прогрессию опухоли. Методом вестерн-блоттинга авторы показали, что клетки всех исследованных линий экспрессировали VEGF-R1 (но не VEGF-R2). Кроме того, эксперименты с использованием камеры Бойдена и полужидкого агара продемонстрировали, что такие характерные для неопластических клеток свойства, как миграция, инвазия и независимый от субстрата рост, усиливались при стимуляции рецептора 1 типа лигандами VEGF-A и -B, а блокада VEGF-R1 специфическими антителами подавляла эти реакции [49,127].

Впоследствии на клеточных линиях карциномы молочной железы MDA-MB-231 и MCF-7, а также в экспериментах на животных было доказано и

антиапоптотическое действие VEGF-R1 [81]. При помощи РНК-интерференции авторы подавляли экспрессию одного из генов - VEGF-R1 или VEGF-R2. Оказалось, что отсутствие VEGF-R2 никак не влияло на выживаемость опухолевых клеток. Напротив, нокадаун гена, кодирующего VEGF-R1, приводил к увеличению количества апоптотически гибнущих клеток на 38%. При этом блокада рецептора 1 типа специфическими антителами не повышала уровень апоптоза, из чего был сделан вывод о локализации VEGF-R1 внутри клетки.

В последующих опытах авторы исследования подтвердили внутриклеточное расположение рецептора: с помощью иммуоцитохимического окрашивания и конфокальной микроскопии была показана ко-локализация рецептора 1 типа с ядерными ламинами. Ламины, как известно, ответственны за формирование оболочки ядра и организацию хроматина, а их деградация может приводить к апоптозу. Исходя из полученных данных, авторами был выдвинут тезис, что VEGF-R1 защищает опухолевые клетки от гибели путём физической стабилизации ядерной ламины.

Дальнейшие эксперименты *in vivo* на бестимусных мышах также подтвердили антиапоптотический эффект рецептора 1 типа: клетки MDA-MB-231 и MCF-7 с «выключенным» VEGF-R1 формировали значительно меньшие по объёму опухолевые узлы по сравнению с клетками, экспрессирующими данный рецептор.

Существенный вклад VEGF-R1 в выживаемость злокачественных клеток продемонстрирован и в другом исследовании [25]. Методом иммунокопреципитации было установлено, что внутриклеточная стимуляция рецептора VEGF-лигандом запускает антиапоптотические сигнальные каскады, в то время как подавление активности VEGF-R1 при помощи РНК-интерференции значительно снижает выживаемость клеток рака толстой кишки. Эти результаты нашли своё подтверждение в экспериментах Huang Y. et al., проведённых на клеточных линиях того же гистогенеза [72]. TUNEL-методом было выявлено, что опухолевые клетки с высокой экспрессией VEGF-R1 (Flt1+) менее чувствительны к 5-фторурацилу, чем клетки, не содержащие рецептор (Flt1-). Кроме того,

привитые бестимусным мышам клетки Flt1+ формировали опухолевые узлы значительно большего размера. Опираясь на полученные результаты, авторы предложили рассматривать VEGF-R1 в качестве маркера «стволовых» клеток неоплазмы.

В исследовании [119] продемонстрирован вклад рецептора 1 типа не только в выживаемость опухолевых клеток, но и в резистентность к лучевому воздействию. На нескольких линиях клеток карциномы полости рта клоногенным методом было установлено, что клетки, экспрессирующие VEGF-R1, обладали повышенной устойчивостью к γ -облучению.

Ещё одним указанием на связь между рецептором 1 типа и опухолевой прогрессией может служить присутствие в неопластических клетках двух его специфических лигандов – VEGF-B и PlGF. Так, содержание VEGF-B в клетках плоскоклеточного рака лёгких и меланомы человека коррелирует с плохим прогнозом вследствие высокой вероятности метастазирования [85,131]. PlGF, как установлено Taylor A. P. et al., усиливает миграцию клеток карциномы молочной железы, модулируя перестройку их цитоскелета [113]. Учитывая возможность связывания обоих лигандов только с VEGF-R1, логично предположить, что именно его активация и опосредует все вышеописанные процессы.

О взаимосвязи между содержанием рецептора 1 типа и плохим прогнозом онкозаболевания свидетельствует также анализ клинических данных. В исследовании, охватывающем почти 2000 больных с раком молочной железы, было показано, что VEGF-R1 выявлялся не только в эндотелиоцитах сосудов опухоли, но и в самих клетках карциномы молочной железы. И именно во втором случае степень экспрессии рецептора коррелировала с высоким риском метастазирования и рецидивирования; в отношении VEGF-R2 такой зависимости отмечено не было [41,42].

Таким образом, полученные к настоящему времени экспериментальные и клинические данные всё больше указывают на важную роль рецептора 1 типа в опухолевом росте и прогрессии. А учитывая тот факт, что VEGF-R1 экспрессируется, главным образом, в неопластических клетках и практически не

представлен (за редким исключением) в нормальных, он в перспективе вполне может претендовать на роль новой молекулярной мишени для таргетной терапии новообразований.

Возможность молекулярно-направленного воздействия на рецептор была подтверждена Owen L. A. et al. в 2013 году [90]. При введении синтетического морфолино-олигонуклеотида (блокирующего образование mVEGF-R1 и компенсаторно увеличивающего выход растворимых изоформ рецептора) непосредственно в аденокарциному молочной железы, перевитую бестимусным мышам, отмечено уменьшение объёма неоплазмы до 88,9% и снижение плотности микрососудов до 50%. Полученные впечатляющие результаты, вероятно, объясняются тем, что такое «перепрограммирование» сплайсинга позволило добиться двойного эффекта. С одной стороны, антиангиогенного за счёт повышения в опухолевом узле концентрации растворимых изоформ (связывающих лиганд и формирующих с мембранными VEGF-R1 и -R2 нефункциональные «химерные» комплексы), а с другой, - непосредственно противоопухолевого путём прямого подавления полноразмерного рецептора mVEGF-R1.

Однако, как отмечают авторы исследования, действие морфолино-олигонуклеотидов сильно зависит от дозы и носит преходящий характер, то есть для поддержания возникающего эффекта требуются перманентные инъекции, что неудобно с практической точки зрения. Возможно, применение других генных технологий, как, например, РНК-интерференции или недавно открытой методики CRISPR-Cas9, позволит добиться более длительного и стабильного противоопухолевого действия.

1.3. Заключение

Со времени своего открытия VEGF-R1 рассматривали лишь в качестве негативного регулятора ангиогенеза, который в период внутриутробного развития призван сдерживать избыточное формирование кровеносных сосудов плода, а у взрослых в норме играет очень ограниченную роль.

Однако в последнее время появились данные, что в опухолевых клетках VEGF-R1 способен выполнять ряд функций, напрямую не связанных с ангиогенезом. Имеются сообщения, что экспрессия рецептора сопровождается повышением выживаемости неопластических клеток, а также усилением фенотипических проявлений их злокачественности (миграция, инвазия, метастазирование). Эти «неангиогенные» эффекты VEGF-R1 отмечены для самых разных типов опухолевых клеток, где и само присутствие рецептора косвенно указывает на его важный вклад в канцерогенез. Несмотря на эти вновь открывшиеся факты, заставляющие по-иному взглянуть на биологическую роль VEGF-R1 при злокачественном росте, работ по этой тематике крайне мало. К тому же каждая группа авторов изучала какой-то один конкретный аспект: промежуточные звенья сигнальных каскадов, экспрессию VEGF-R1 в клетках только определённого гистогенеза и т. д. Такие разрозненные данные пока не позволяют установить механизм действия рецептора и составить более или менее целостную картину его функционирования. Более того, на сегодняшний день точно не определена даже клеточная локализация VEGF-R1, что помогло бы ответить на вышеупомянутые вопросы.

Необходимость дальнейшего изучения молекулярно-биологических характеристик рецептора (распределения по клеточным компартментам, механизма активации и передачи сигнала, связи между уровнем его экспрессии и злокачественностью клеток и др.) продиктована не только фундаментальным интересом, но и потенциальным значением для практической онкологии. Ограниченное значение VEGF-R1 во взрослом организме означает, что подавление активности рецептора представляет собой вполне выполнимую терапевтическую задачу.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Линии клеток

В качестве объектов исследования использовали 4 линии опухолевых клеток человека различного гистогенеза: A431 (рак наружных женских половых органов) [62], Sn12с (светлоклеточная карцинома почки) [89], A549 (немелкоклеточный рак лёгкого) [83], BRO (высококочкачественная низкодифференцированная меланома кожи) [87]. Контрольными линиями нормальных клеток служили ПФЧ (теломеризованные постнатальные фибробласты человека) [132] и H1036 (нормальные человеческие фибробласты). Все перечисленные линии получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института Цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки выращивали в среде DMEM (Gibco, Великобритания), содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки, 2 mM L-глутамин и антибиотик гентамицин (40 мкг/мл), при температуре 37°C и подаче влажного воздуха с 5% CO₂. Для снятия клеток с подложки применяли 50 mM раствор ЭДТА в PBS (Версен) либо раствор Трипсин-Версена в соотношении 1:3. Клетки пересеивали каждые 2-3 суток в исходной концентрации 1,5*10⁵/мл. Во всех экспериментах использовали клетки в логарифмической фазе роста.

2.2. Экспрессия гена VEGF-R1 (Flt1)

2.2.1. Обратная транскрипция (ревертирование)

Экстракцию тотальной клеточной РНК осуществляли с использованием реагента TRIzol (Invitrogen, США). Реакционная смесь для синтеза первой цепи кДНК содержала следующие компоненты: 4 мкл 5-кратного буфера (280 mM Трис-НСl, pH 8.7; 375 mM KCl; 30 mM MgCl₂); 2 мкл смеси dNTP (по 10 mM каждого дезоксинуклеозидтрифосфата); 2 мкл 20 mM дитиотреитола (ДТТ); 2 мкл праймера oligo-dT (20 мкМ); 2 мкл раствора MMLV-ревертазы (всё – Евроген, Россия); 2 мкл (~2 мкг) РНК-матрицы; 6 мкл стерильной воды; каплю минерального масла (10-20 мкл). Перед постановкой реакции смесь праймеров и

РНК-матрицы прогревали в течение 2 мин. при 70°C для плавления вторичной структуры. Ревертирование проводили на амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология, Россия), время - 60 мин., температура - 42°C. Для остановки реакции (инактивации фермента) смесь нагревали в течение 10 мин. при 70°C.

2.2.2. Полуколичественная ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Реакционная смесь для наработки продуктов ПЦР содержала 1 мкл раствора кДНК; по 20 пкМ каждого из праймеров; 2,5 мМ смеси dNTP (MBI Fermentas, Литва); 2,5 мкл 10-кратного буфера с (NH₄)₂SO₄ (MBI Fermentas, Литва); 25 мМ MgCl₂; 1 ед. Taq-ДНК-полимеразы (MBI Fermentas, Литва); стерильную воду до конечного объема 25 мкл; 10-20 мкл минерального масла. Использованные для определения экспрессии VEGF-R1 (Flt1) нуклеотидные последовательности специфических праймеров приведены в табл.2.

Таблица 2 - Нуклеотидные последовательности праймеров к VEGF-R1 для полуколичественной ПЦР.

| Название праймера | Нуклеотидная последовательность | Размер ампликона |
|-------------------|---------------------------------|------------------|
| FLT1-F | 5'-CAGCTCCAAATATCTAGCTGTACC-3' | 436 bp |
| FLT1-R | 5'-GAGGACAAGAGTATGGCCTCTAAG-3' | |

Полуколичественную ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология, Россия) по следующей схеме: денатурация — 94°C, 10 с; отжиг праймеров — 60°C, 10 с; синтез — 72°C, 20 с. Всего 35 циклов.

В качестве внутреннего контроля для оценки количества/качества кДНК определяли экспрессию гена GAPDH (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы) с помощью соответствующих праймеров, приведённых в табл.3.

Таблица 3 - Нуклеотидные последовательности праймеров к GAPDH для полуколичественной ПЦР.

| Название праймера | Нуклеотидная последовательность | Размер ампликона |
|--------------------------|--|-------------------------|
| GAPDH-F | 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3' | 496 bp |
| GAPDH-R | 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3' | |

Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в концентрации 0,5 мкг/мл. Длину фрагментов оценивали в соответствии с расположением полос маркерной ДНК. Гель фотографировали при ультрафиолетовом возбуждении с помощью цифровой камеры Samsung CCTV LENZ (Южная Корея).

2.2.3. ПЦР в режиме реального времени (qPCR)

Реакционная смесь включала 5 мкл 5-кратного готового буфера qPCRmix-NS-SYBR (Евроген, Россия) с интеркалирующим красителем SYBR Green I, высокоточной Taq-полимеразой и ингибиторами её активности для «горячего старта»; 2,5 мкл раствора MgCl₂; 2 нг полученной в ходе ревертирования кДНК; 2,5 мкл праймеров с концентрацией 4 мкМ; стерильную воду до конечного объёма 25 мкл; 10-20 мкл минерального масла. Оценку экспрессии мембранно-связанной (mFlt1) и растворимой (sFlt1) изоформ осуществляли с использованием оригинальных, разработанных с помощью программы Vector NTI (ThermoFisher, США) праймеров с нуклеотидными последовательностями, приведёнными в табл.4.

Таблица 4 - Нуклеотидные последовательности праймеров к мембранно-связанной и растворимой изоформам VEGF-R1 для ПЦР в режиме реального времени.

| Название праймера | Нуклеотидная последовательность | Размер ампликона |
|-------------------|----------------------------------|------------------|
| mFlt1-F | 5'-CCTTTGAAGAACTTTTACCGAATGCC-3' | 181 bp |
| mFlt1-R | 5'-ACATCAGACAGCCCCGACTCCTTAC-3' | |
| sFlt1-F | 5'-GGCTGTTTTCTCTCGGATCTC-3' | 158 bp |
| sFlt1-R | 5'-CATCTCCTCCGAGCCTGAAAG-3' | |

Отрицательным контролем служили пробы без добавления кДНК.

Аmplификацию в реальном времени проводили на термоциклере CFX-96 (BioRad, США). Перед постановкой реакции смесь прогревали в течение 5 мин. при температуре 95°C. Цикл проводили по следующей схеме: денатурация — 95°C, 10 с, отжиг праймеров - 55,5°C, 10 с, синтез - 72°C, 10 с, далее оценка уровня SYBR-флуоресценции. Количество циклов равнялось 40.

В качестве внутреннего контроля определяли экспрессию генов GAPDH и hHPRT1 (гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза) с помощью праймеров, приведенных в табл.5.

Таблица 5 - Нуклеотидные последовательности праймеров к GAPDH и hHPRT1 для ПЦР в режиме реального времени.

| Название праймера | Нуклеотидная последовательность | Размер ампликона |
|-------------------|---------------------------------|------------------|
| GAPDH-F | 5'-GTGGACCTCATGGCCTACAT-3' | 129 bp |
| GAPDH-R | 5'-TGTGAGGGAGATGCTCAGTG-3' | |
| hHPRT1-F | 5'-TGACACTGGCAAAACAATGCA-3' | 94 bp |
| hHPRT1-R | 5'-GGTCSTTTTCACCAGCAAGCT-3' | |

Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения BioRad CFX Manager. Критерием уровня экспрессии соответствующей мРНК служил показатель $C(t)$ – количество циклов достижения флуоресценции, превышающей «порог шума».

2.3. Оценка уровня и клеточной локализации белка VEGF-R1

2.3.1. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток (ИЦХ)

Для ИЦХ-исследования стёкла с растущими на них клетками разделяли на две группы. Клетки одной группы сразу фиксировали в 96% этаноле (5 мин.), а затем в ацетоне (3 мин.) при -20°C . Живые клетки другой группы до их фиксации обрабатывали 0,05% PBST (0,05% раствор Тритона-X100 в PBS). Инкубацию в детергенте тщательно контролировали под микроскопом до момента чёткого проявления цельных ядер с визуально неповреждённой оболочкой на фоне вымывающейся цитоплазмы. Вышеописанная процедура способствовала элиминации цитозольного VEGF-R1 и увеличению доступности ядерных антигенов для антител. После фиксации клетки обеих групп блокировали 5% BSA в PBS. В качестве первичных использовали кроличьи АТ #ab2350 (Abcam, Великобритания) к внутриклеточному домену VEGF-R1 (узнающие только мембранно-связанную изоформу рецептора) в концентрации 5 мкг/мл по 40 мкл на пробу, а вторичных - FITC-конъюгированные антикроличьи антитела #ab6717 (Abcam, Великобритания) в разведении 1:1000 по 40 мкл. Отрицательным контролем служили клетки, обработанные только вторичными АТ. Препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе Zeiss Axio Scope A1 (Германия).

2.3.2. Непрямая реакция иммунофлуоресценции на проточном цитометре с интактными и пермеабелизованными клетками (РИФ)

Количественную оценку содержания VEGF-R1 на поверхности клетки и внутри неё определяли на проточном цитометре с помощью непрямой реакции иммунофлуоресценции. При анализе интактных клеток сигнал детектируется только от VEGF-R1 с цитоплазматической мембраны, а после её пермеабелизации

антителам становится доступен и внутриклеточный рецептор. Концентрация клеток для анализа в каждой пробе была равна $1 * 10^6$ клеток/мл. Часть клеток оставляли интактными, а другую подвергали пермеабиллизации 90%-м охлаждённым метанолом. К опытным пробам добавляли по 40 мкл первичных мышинных моноклональных антител #MAB321 (“R&D Systems”, США) к внеклеточному домену VEGF-R1 (распознающих как мембранно-связанную, так и растворимую изоформы рецептора) в концентрации 50 мкг/мл и инкубировали в течение 30 мин. После отмывки в PBS с 5% BSA добавляли вторичные FITC-конъюгированные антимышинные АТ #STAR70 (AbD Serotec, Великобритания) в концентрации 10 мкг/мл по 20 мкл на пробу и инкубировали 30 мин. при +4°C. Далее клетки дважды отмывали в 5% растворе BSA и ресуспендировали в 300 мкл 1% раствора формалина в PBS. Отрицательным контролем служили пробы, обработанные только вторичными антителами. Интенсивность флуоресценции меченых белков оценивали на проточном цитометре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с возбуждением фотолюминесценции аргоновым лазером ($\lambda=488$ нм). Анализируемый гейт устанавливали на основании комбинации светорассеяния и размера клеток с использованием программного обеспечения BD FACSDiva. Количественными критериями содержания соответствующего протеина служили показатель Δ MFI (Mean Fluorescence Intensity) - разность средней интенсивности флуоресценции между опытными и контрольными (обработанными только вторичными антителами) образцами – и процент экспрессирующих белок клеток.

2.4. Исследование содержания VEGF-R1 в клеточном ядре

Несмотря на несомненные достоинства реакции иммунофлуоресценции на проточном цитометре, в числе которых можно выделить объективность, точность и высокую воспроизводимость результатов, РИФ в своём классическом варианте (то есть на клетках) позволяет детектировать антигены или на наружной поверхности клетки, или внутри неё (после предварительной пермеабиллизации). Однако даже регистрация искомого белка внутри клетки не позволяет сделать

вывод о его присутствии в ядре. Поэтому с целью определения ядерной локализации VEGF-R1 нами впервые был разработан метод экстракции интактных клеточных ядер, пригодных для анализа на проточном цитометре [12].

2.4.1. Выделение клеточных ядер

В качестве основы буфера для экстракции ядер был подобран гипоосмолярный раствор, содержащий HEPES (10 mM, pH 7,9), MgCl₂ (5 mM), EDTA (0,1 mM). К 50 мл исходного буфера добавляли 2,0 мл 10% раствора детергента Тритона-X100, а непосредственно перед применением - дитиотреитол (из расчёта 1 мкл на 1 мл буфера), а также антипротеазную смесь («Complete, Mini; Roche», Швейцария) по инструкции производителя.

Клетки в количестве 1×10^7 отмывали от среды при 1000 об./мин. в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в 1,0 мл холодного PBS, переносили в чистую пробирку и повторно отмывали 2 мин. при 2000 об./мин. Супернатант отбирали, а полученный осадок ресуспендировали в 150 мкл буфера и оставляли для инкубации на 60 мин. при +4°C. Все дальнейшие манипуляции проводили на льду. Чтобы дополнительно разрушить набухшие клетки, полученную суспензию не менее 10 раз пропускали через шприц с иглой 26G, после чего отделяли цитозольную фракцию путём 3-минутного центрифугирования на скорости 7000 об./мин. при +4 °C. Супернатант (цитоплазматическая фракция) отбирали и хранили при -80°C до использования, а осадок (ядерная фракция) повторно отмывали от остатков цитоплазмы в 1,0 мл буфера. Далее для стабилизации экстрагированные ядра инкубировали в 5 mM растворе MgCl₂ в PBS в течение 18-24 ч при +4°C.

2.4.2. Цитологический анализ ядер

Очищенность ядерной фракции от примесей цитоплазмы контролировали с помощью окрашивания разведённой в 5 раз суспензии ядер азур-эозином по Романовскому и гематоксилином по Майеру. Для этого мазки фиксировали 5 мин в 90% метаноле, высушивали и окрашивали. Препараты изучали под световым

микроскопом Nikon (Япония) при увеличении X400, анализируя не менее 10 полей зрения.

2.4.3. Мечение ядер антителами

500 мкл ядерной суспензии, что примерно соответствовало количеству 5×10^6 ядер, переносили в каждую из пробирок для измерений. Сохранность ядерных белков определяли по уровню двух специфических маркёров - PCNA и ламина A/C. С этой целью применяли первичные мышинные моноклональные антитела к PCNA ab#29 (Abcam, Великобритания) в концентрации 50 мкг/мл по 50 мкл на пробу, а также первичные мышинные АТ к ламину A/C sc-7292 (Santa Cruz, США) по 1 мкг на пробу. В качестве вторичных в обоих случаях использовали FITC-конъюгированные антимышинные антитела #STAR70 в концентрации 10 мкг/мл по 30 мкл на пробу.

Чтобы убедиться в отсутствии остатков цитоплазмы в ядерном экстракте, использовали первичные кроличьи АТ к цитоплазматическому маркёру β -тубулину #2146 (Cell Signaling Technology, США) в разведении 1:100 по 50 мкл на пробу. Вторичными антителами служили FITC-конъюгированные антикроличьи #STAR121F (AbD Serotec, Великобритания), разведённые 1:200 по 30 мкл на пробу.

С целью измерения VEGF-R1 ядра метили, используя в качестве первичных мышинные моноклональные АТ #MAB321 ("R&D Systems", США) в концентрации 50 мкг/мл по 50 мкл на пробу, а вторичных - FITC-конъюгированные антимышинные антитела #STAR70 в концентрации 10 мкг/мл по 30 мкл на пробу. Во всех случаях отрицательным контролем служили пробы, обработанные только вторичными АТ.

2.4.4. Анализ ядер на проточном цитометре

Исследование ядер проводили на проточном цитометре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva. Область гейтирования определяли на логарифмическом графике

«DotPlot» FSC/SSC. Для выбора гейта ядерную суспензию окрашивали раствором пропидий йодида (Vecton Dickinson, США). С этой целью ядра в количестве 5×10^6 инкубировали в 500 мкл раствора пропидий йодида (концентрация 50 мкг/мл) в течение 30 мин. в темноте.

На графике «DotPlot» FSC/SSC фракция цельных ядер соответствует «облаку» в верхней правой области рисунка (рис.10а), что подтверждается гистограммой клеточного цикла ядер, окрашенных пропидий йодидом (рис.10b).

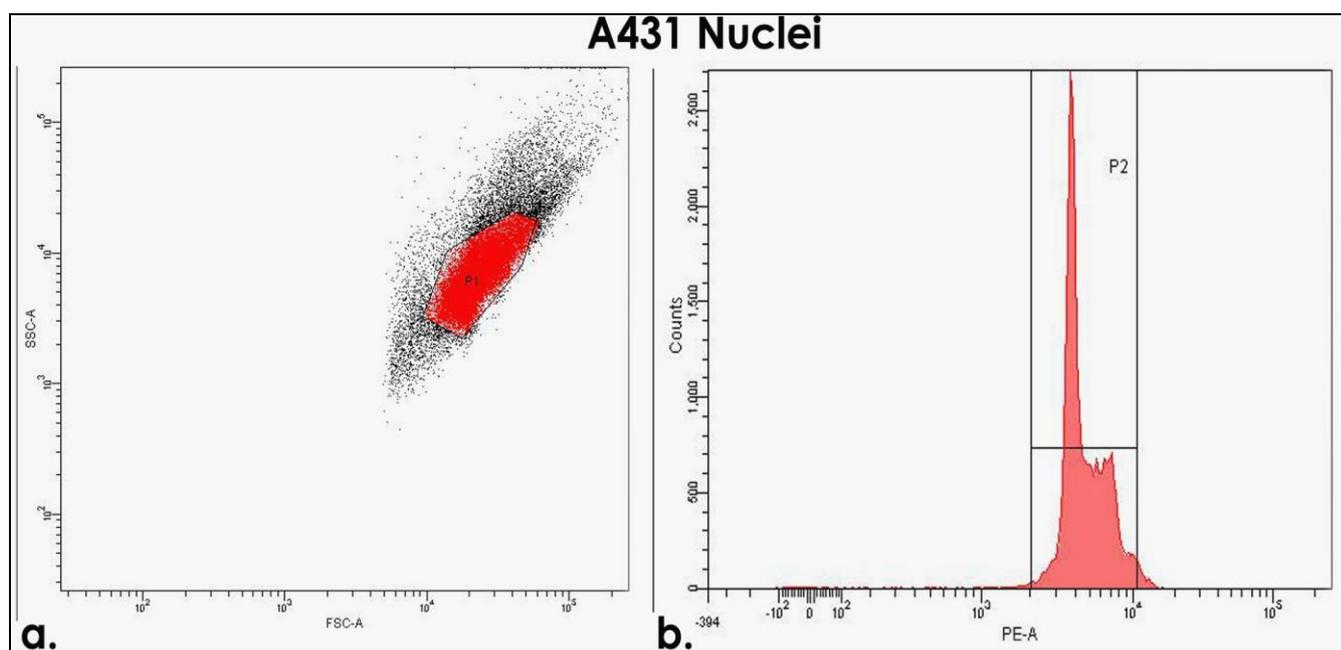


Рисунок 10 - Выбор гейта для ядер клеток линии A431.

a - график «DotPlot» FSC/SSC. Одиночные, очищенные от цитоплазмы ядра выделены красным цветом; **b** - гистограмма клеточного цикла (окраска пропидий йодидом) подтверждает правильность выбора гейта.

Количественными критериями уровня соответствующего протеина в ядре служили показатель Δ MFI (Mean Fluorescence Intensity) – разность средней интенсивности флуоресценции между опытными и контрольными (обработанными только вторичными антителами) образцами – и процент экспрессирующих белок ядер.

2.4.5. Вестерн-блоттинг

В экспериментах использовали цитоплазматический и ядерный белковые клеточные лизаты. Для получения лизатов клетки в количестве 1×10^7 помещали в 300 мкл ледяного гипоосмолярного буфера (10 mM HEPES с pH 7,9; 5 mM $MgCl_2$; 0,1 mM EDTA; 0,4% Тритон-X100; 1 мкМ DTT; антипротеазная смесь). После инкубации в течение 30 мин. при $+4^\circ C$ раствор не менее 10 раз пропускали через шприц с иглой 26G и центрифугировали при 7000 об./мин. 3 мин. Полученный супернатант (цитоплазматический лизат) отбирали, а осадок использовали для выделения ядерных белков. С этой целью применяли гиперосмолярный буфер, содержащий 0,4 M KCl, 20 mM HEPES (pH 7,9), 1 mM EDTA, 10% глицерола, 0,5% дезоксихолата натрия, 0,1% додецилсульфата натрия (SDS), 1 мкМ DTT и антипротеазную смесь. После 30-минутной инкубации при $+4^\circ C$ для разрушения ДНК раствор обрабатывали ультразвуком с частотой 3,4 МГц (обработка – 5 сек., перерыв - 5 сек., 4 цикла) и далее центрифугировали при 18000 об./мин. в течение 20 мин. Полученный супернатант представлял собой экстракт ядерных белков клетки.

Концентрацию белка определяли с помощью набора Quant-IT Protein Assay Kit (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя путем измерения оптической плотности на спектрофлуориметре Quibit 2.0 (Invitrogen, США). Разделение протеинов по молекулярной массе осуществляли в 6% полиакриламидном геле с добавлением 0,1% SDS. Влажный перенос на нитроцеллюлозную мембрану проводился в течение 18-24 ч с использованием Tris-глицинового буфера с объемной долей метанола не более 15%.

Для предотвращения неспецифической сорбции мембрану обрабатывали 5% раствором сухого молока (Applichem, Германия) в Tris-солевом буфере с 0,1% Tween 20 (TBST). Первичными антителами для определения VEGF-R1 служили мышинные моноклональные АТ #MAB321 (“R&D Systems”, США) в концентрации 1 мкг/мл, инкубация 12-18 ч при $+4^\circ C$. Далее мембрану отмывали раствором TBST при комнатной температуре и инкубировали 1,5 часа со вторичными антимышиными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, NA931

(Amersham, США), после чего добавляли хемилюминесцентный субстрат Clarity ECL (BioRad, США). Реакцию хемилюминесценции регистрировали на приборе ChemiDoc Touch (BioRad, США). Денситометрический анализ проводился с помощью программы ImageJ (NIH, США).

2.5. Статистическая обработка результатов

Во всех независимых экспериментах (не менее 3-х) проводили по 3 измерения в каждой точке. Результаты исследований подвергали статистической обработке по t-тесту Стьюдента. Достоверными различиями считали значения при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Экспрессия гена VEGF-R1 (Flt1)

3.1.1. Полуколичественная ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Методом ОТ-ПЦР в опухолевых клеточных линиях A431, A549 и Sn12c была оценена базальная экспрессия гена Flt1. Количество тотальной кДНК в каждой пробе было нормировано по экспрессии GAPDH (рис.11а).

Судя по интенсивности «свечения» полученных полос, мРНК рецептора 1 типа в небольшом количестве регистрировалась в клетках всех указанных линий (рис.11б).

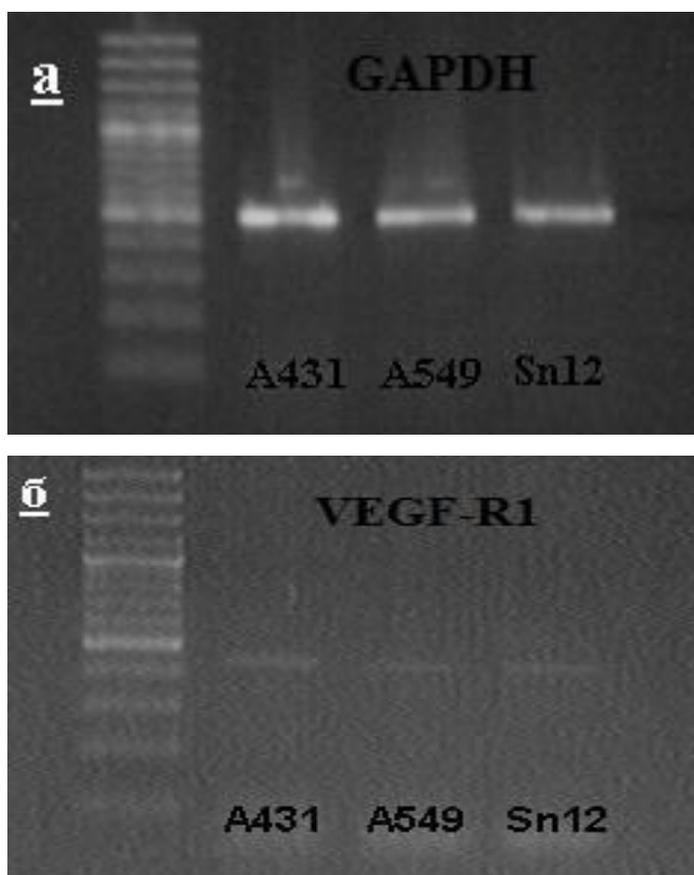


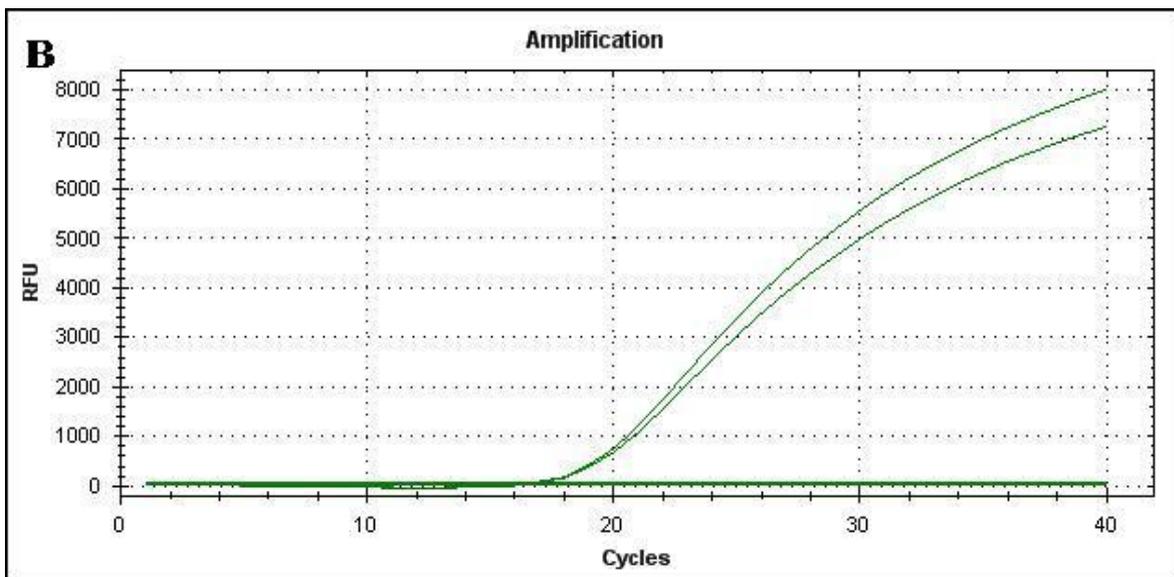
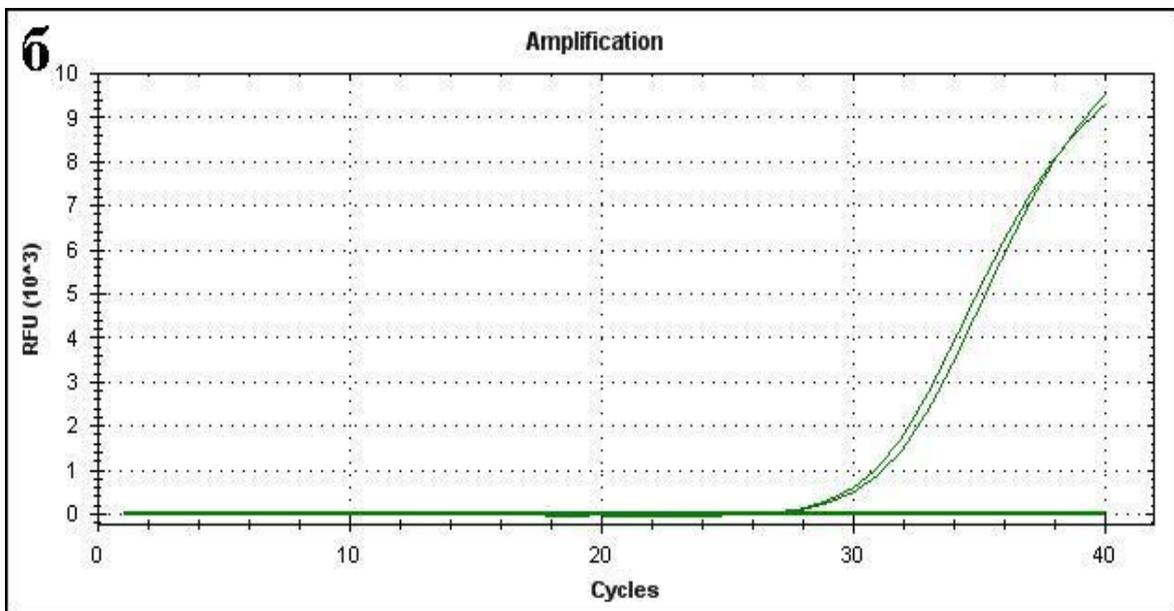
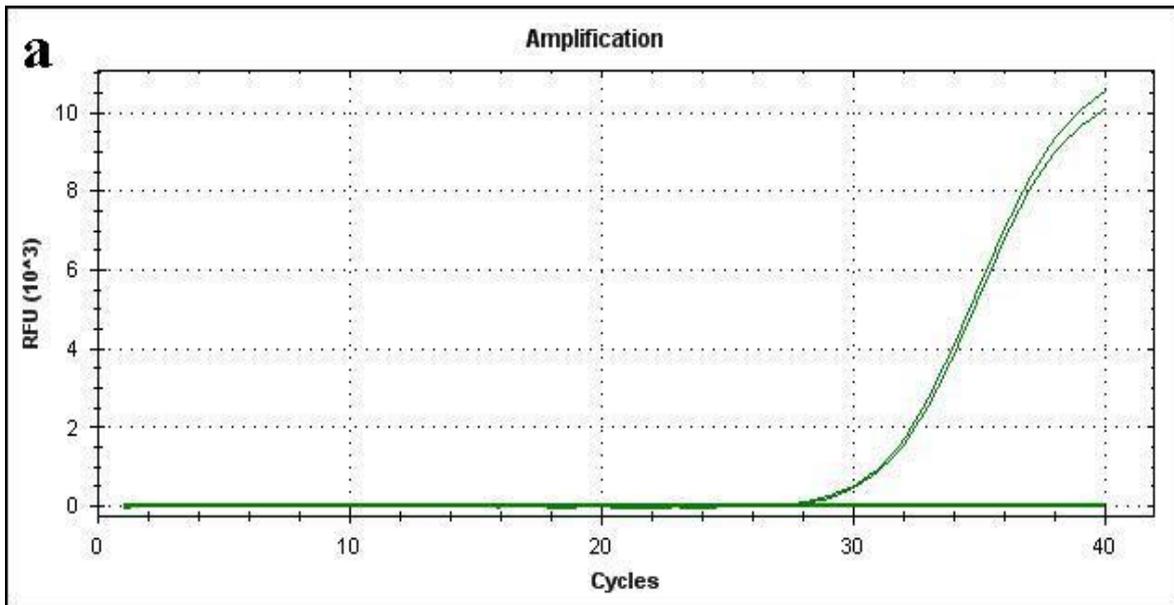
Рисунок 11 - ОТ-ПЦР с клетками A431, A549 и Sn12c. Продукты ОТ-ПЦР окрашены бромистым этидием. Фотография агарозного геля при ультрафиолетовом возбуждении. Слева - полосы маркерной ДНК. **а** - экспрессия гена GAPDH (внутренний контроль количества/качества взятой в реакцию кДНК); **б** - экспрессия гена VEGF-R1 (Flt1).

Более высокий уровень экспрессии VEGF-R1 отмечен в клеточной линии A431. Следует отметить, что используемые праймеры не позволяли отдифференцировать различные сплайсоформы рецептора, поэтому полученные результаты отражают тотальное содержание мРНК VEGF-R1 в исследуемых клетках.

3.1.2. ПЦР в режиме реального времени (qPCR)

Для количественной оценки уровня мРНК VEGF-R1 и определения соотношения мембранно-связанной и растворимой сплайсоформ рецептора в опухолевых клетках A431 проводили ПЦР в режиме реального времени.

Полученные результаты указывают на присутствие в опухолевых клетках мРНК обеих изоформ рецептора: как мембранно-связанной (mVEGF-R1), так и растворимой (sVEGF-R1) (рис.12а, рис.12б). По сравнению с уровнем экспрессии генов GAPDH и hHPRT1 экспрессия сплайсоформ VEGF-R1 оказалась на 3-4 порядка ниже (рис.12в, рис.12г).



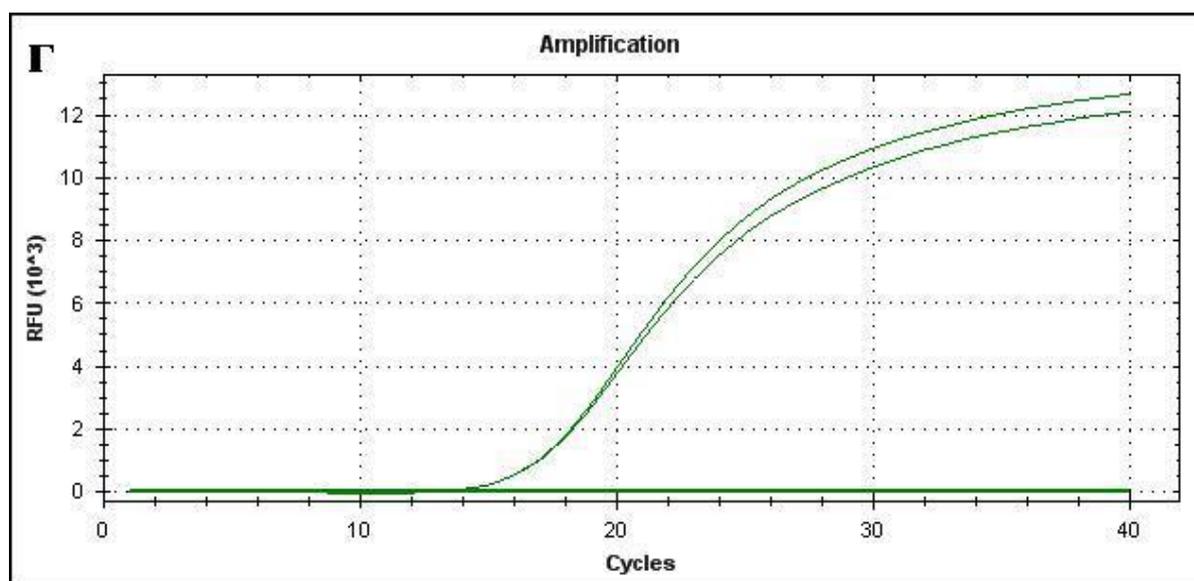


Рисунок 12 - qPCR с клетками A431. График зависимости уровня SYBR-флуоресценции от количества циклов qPCR. Амплификация в контрольных пробах (без кДНК) не превышала пороговый уровень «шума» (горизонтальная линия внизу). **а** - амплификация с праймерами к мембранно-связанной изоформе VEGF-R1 (mVEGF-R1); **б** - амплификация с праймерами к растворимой изоформе VEGF-R1 (sVEGF-R1); **в** - амплификация с праймерами к GAPDH; **г** - амплификация с праймерами к hHPRT1.

Соответствующие значения $C(t)$ и примерное соотношение уровней мРНК исследуемых генов приведены в табл.б.

Таблица б - Значения $C(t)$ и примерное соотношение уровней экспрессии исследованных генов в опухолевых клетках A431. Соотношение вычислено по формуле 2^x , где x - разность большего и меньшего значений $C(t)$. За единицу уровня экспрессии принят уровень экспрессии мембранно-связанной сплайсоформы mVEGF-R1.

| Ген | Показатель $C(t)$ | Примерный уровень экспрессии |
|----------|-------------------|------------------------------|
| hHPRT1 | 14,596±0,397 | ~11000 |
| GAPDH | 16,985±0,82 | ~2100 |
| mVEGF-R1 | 28,013±0,365 | 1 |
| sVEGF-R1 | 27,248±0,251 | ~1,7 |

Как видно из табл.6, количество мРНК sVEGF-R1 превышает таковое для mVEGF-R1 примерно в 1,7 раз. Полученные результаты можно объяснить тем, что клетки в культуре не испытывают недостатка в кислороде и поэтому, наряду с полноразмерной, транскрибируют и растворимую сплайсоформу рецептора.

Таким образом, с помощью полуколичественной ПЦР и qPCR экспрессия гена VEGF-R1 была выявлена во всех исследованных в работе линиях опухолевых клеток человека.

3.2. Идентификация белка VEGF-R1 в опухолевых клетках человека

3.2.1. Локализация VEGF-R1 в опухолевых и нормальных клетках

Иммуноцитохимическое окрашивание проводили на клетках линий A431 (рис.13) и BRO (рис.14). Контролем служили 2 линии нормальных фибробластов человека – ПФЧ (рис.15) и H1036 (рис.16). Используемые в опытах анти-VEGF-R1 антитела выявляли только полноразмерную, мембранно-связанную, изоформу рецептора.

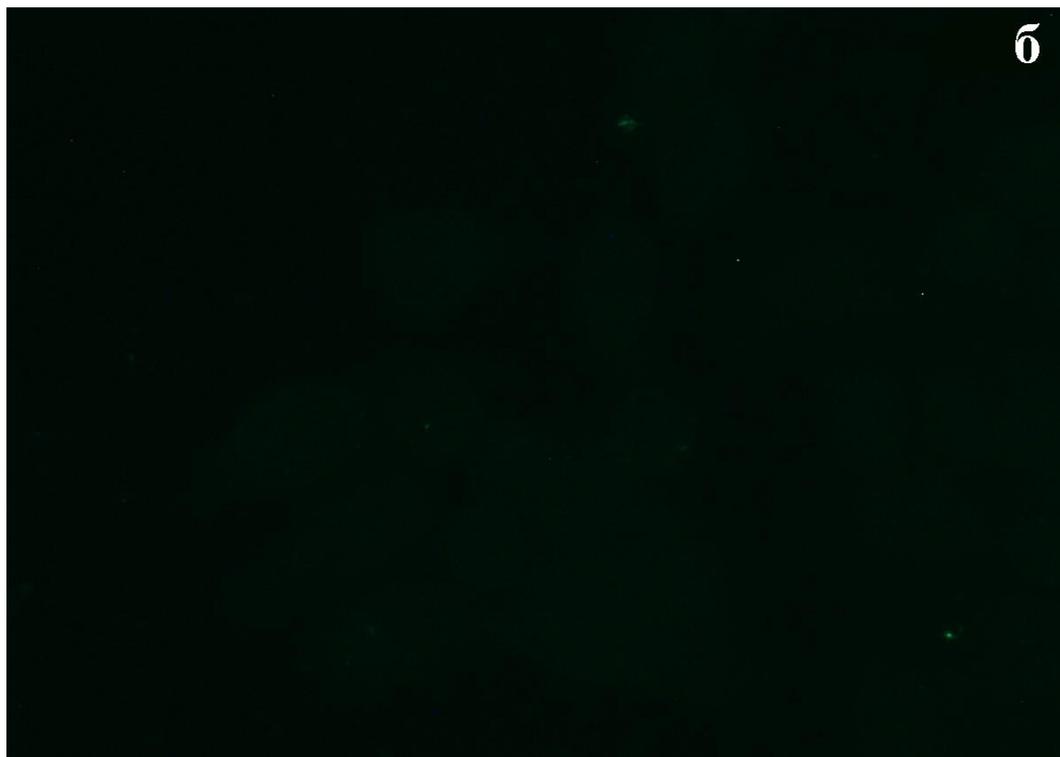
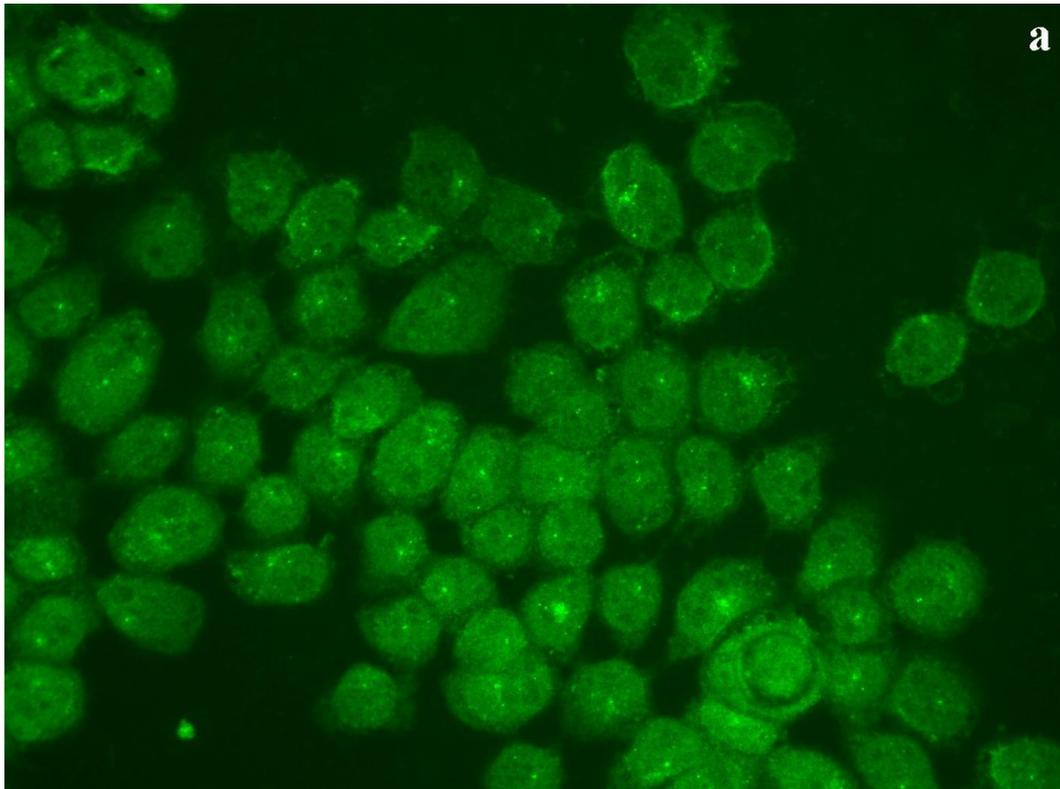


Рисунок 13 - ИЦХ клеток карциномы вульвы человека А431. **а** - опыт: клетки обработаны первичными анти-VEGF-R1 и вторичными FITC-мечеными антителами. Увеличение x 400; **б** - отрицательный контроль: клетки обработаны только вторичными FITC-мечеными антителами. Увеличение x 400.

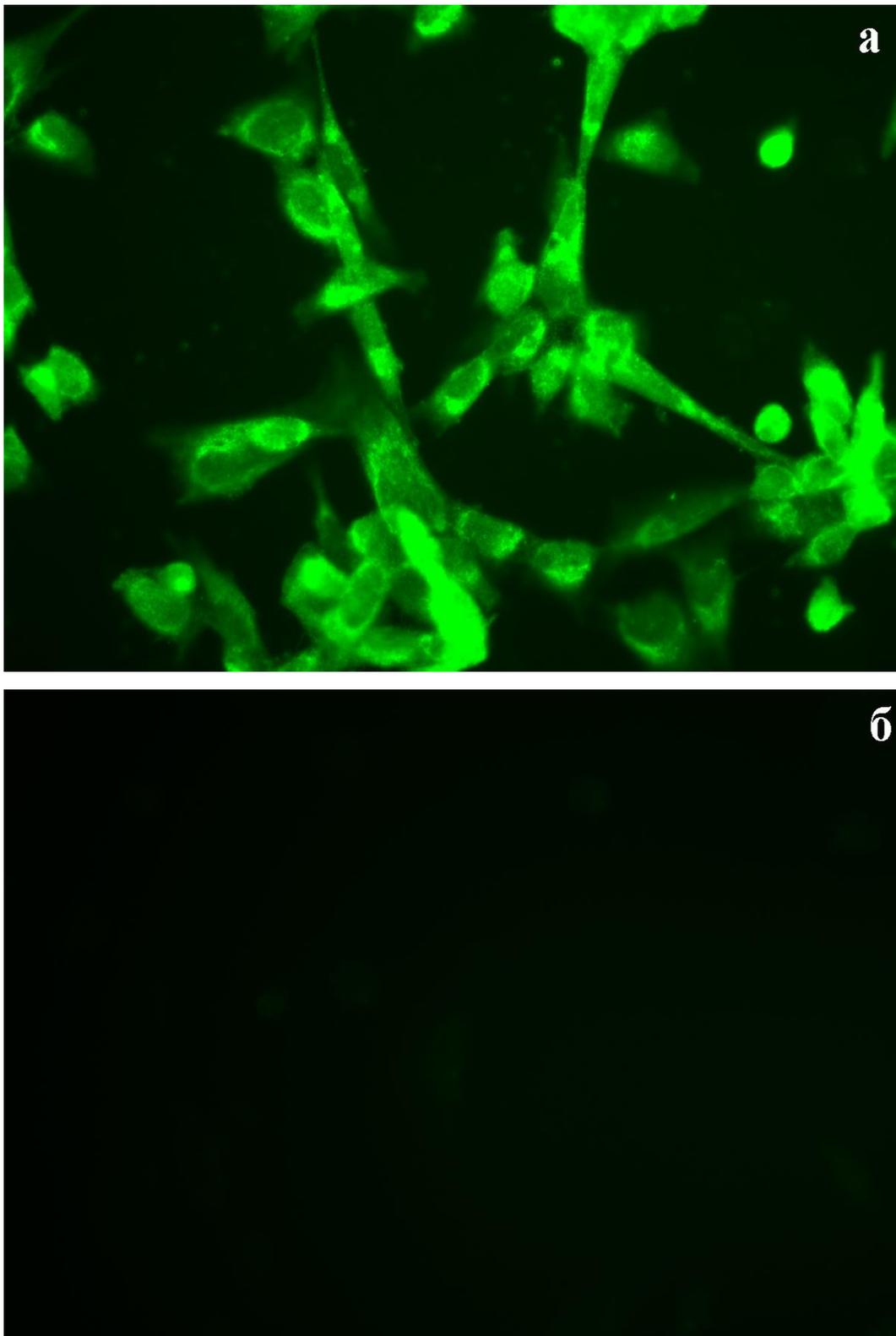


Рисунок 14 - ИЦХ клеток меланомы человека BRO. **а** - опыт: клетки обработаны первичными анти-VEGF-R1 и вторичными FITC-мечеными антителами. Увеличение x 400; **б** - отрицательный контроль: клетки обработаны только вторичными FITC-мечеными антителами. Увеличение x 400.

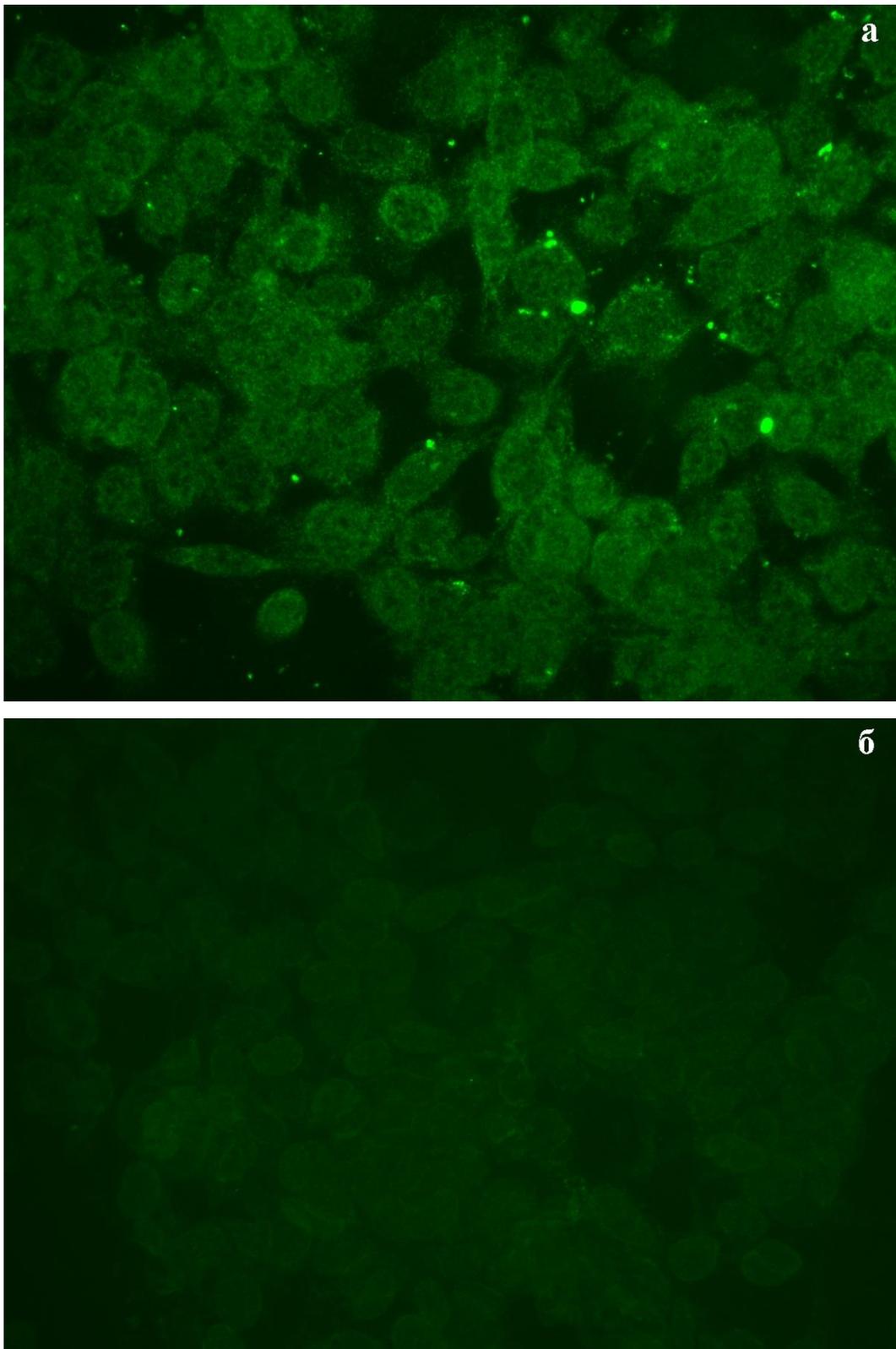


Рисунок 15 - ИЦХ нормальных фибробластов человека линии ПФЧ. **а** - опыт: клетки обработаны первичными анти-VEGF-R1 и вторичными FITC-мечеными антителами. Увеличение x 400; **б** - отрицательный контроль: клетки обработаны только вторичными FITC-мечеными антителами. Увеличение x 400.

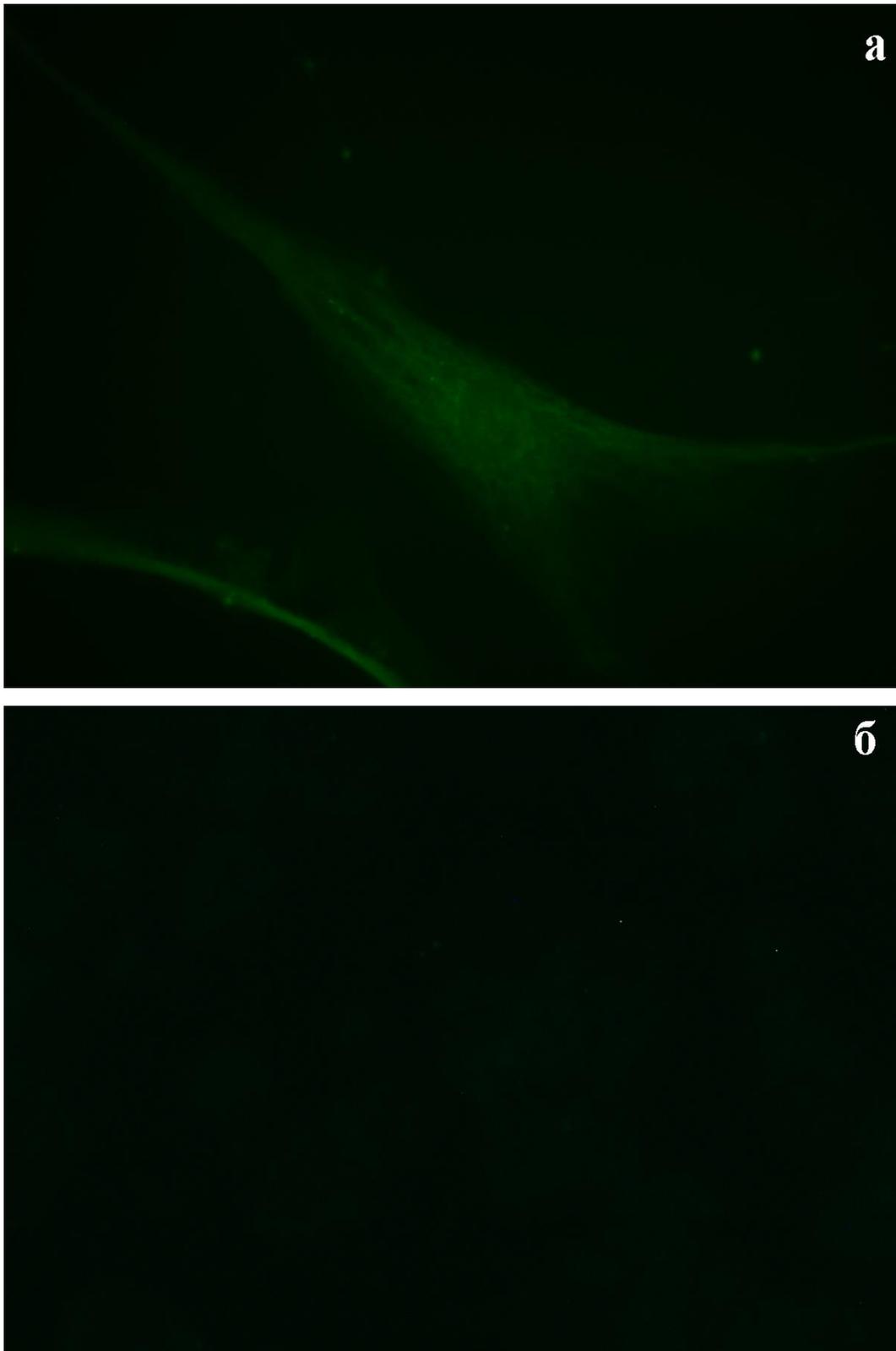


Рисунок 16 - ИЦХ нормальных фибробластов человека H1036. **а** - опыт: клетки обработаны первичными анти-VEGF-R1 и вторичными FITC-мечеными антителами. Увеличение x 400; **б** - отрицательный контроль: клетки обработаны только вторичными FITC-мечеными антителами. Увеличение x 400.

На представленных снимках видно присутствие белка VEGF-R1 как в опухолевых, так и в нормальных клетках, однако в обеих линиях нормальных клеток рецептор визуализируется слабее. Также хорошо заметно, что VEGF-R1 локализуется преимущественно внутри клеток, а не на их поверхности.

3.2.2. Локализация VEGF-R1 в ядрах опухолевых и нормальных клеток

Полученные ИЦХ-изображения не позволяют чётко разграничить флуоресценцию рецептора в цитозоле и ядрах. Поэтому с целью элиминации цитоплазматического пула VEGF-R1 в следующих экспериментах ИЦХ живые клетки перед их фиксацией были обработаны 0,05% PBST. В результате рецептор стал отчётливо визуализироваться в ядрах клеток обеих опухолевых линий (рис.17, рис.18). В отличие от них, в ядрах нормальных клеток VEGF-R1 практически не детектировался (рис.19, рис.20).

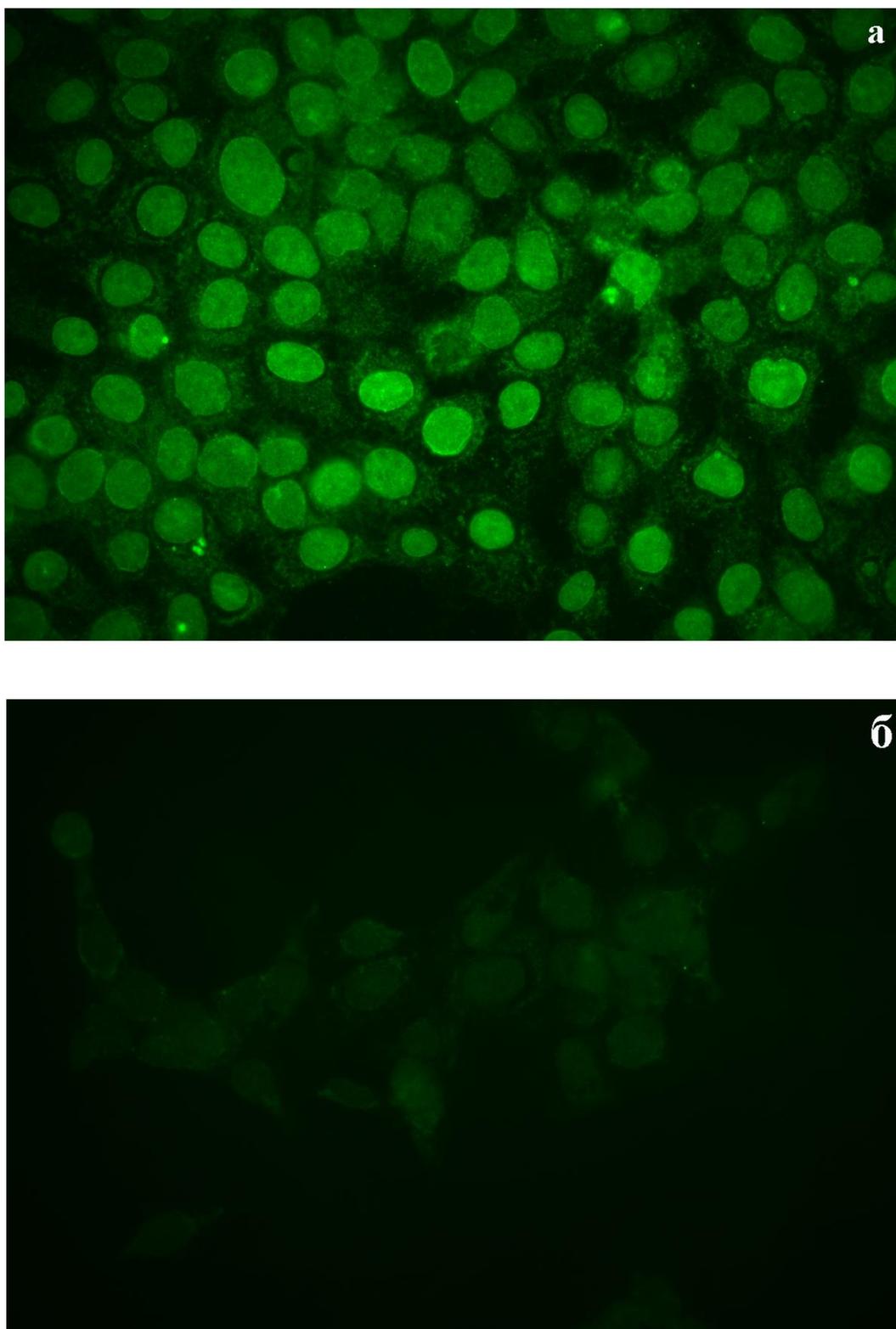


Рисунок 17 - Ядерная локализация VEGF-R1 в клетках A431. ИЦХ-окрашивание после разрушения цитоплазмы детергентом PBST. **а** - опыт: клетки обработаны первичными анти-VEGF-R1 и вторичными FITC-мечеными антителами. Увеличение x 400; **б** - отрицательный контроль: клетки обработаны только вторичными FITC-мечеными антителами. Увеличение x 400.

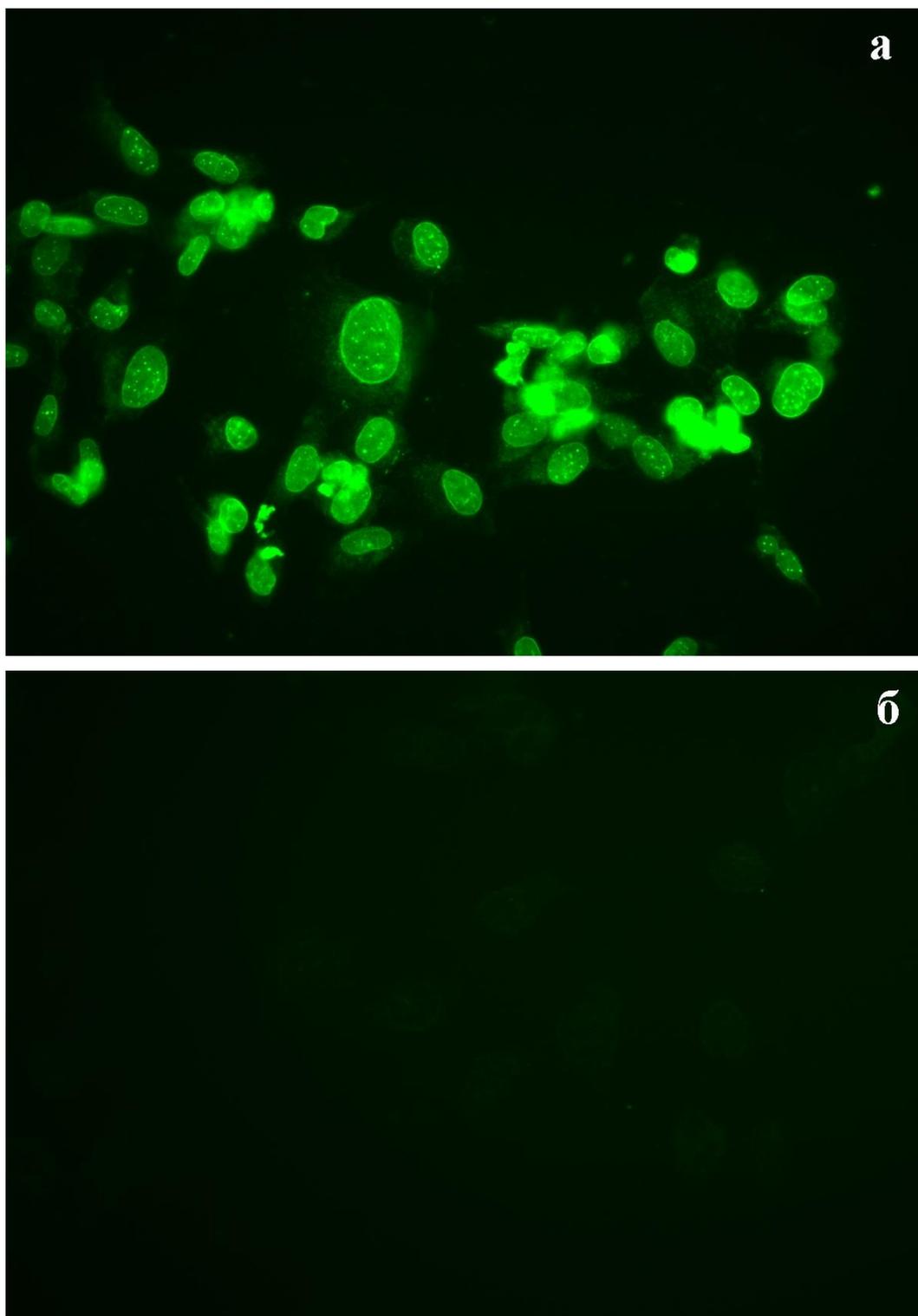


Рисунок 18 - Ядерная локализация VEGF-R1 в клетках BRO. ИЦХ-окрашивание после разрушения цитоплазмы детергентом PBST. **а** - опыт: клетки обработаны первичными анти-VEGF-R1 и вторичными FITC-мечеными антителами. Увеличение x 400; **б** - отрицательный контроль: клетки обработаны только вторичными FITC-мечеными антителами. Увеличение x 400.

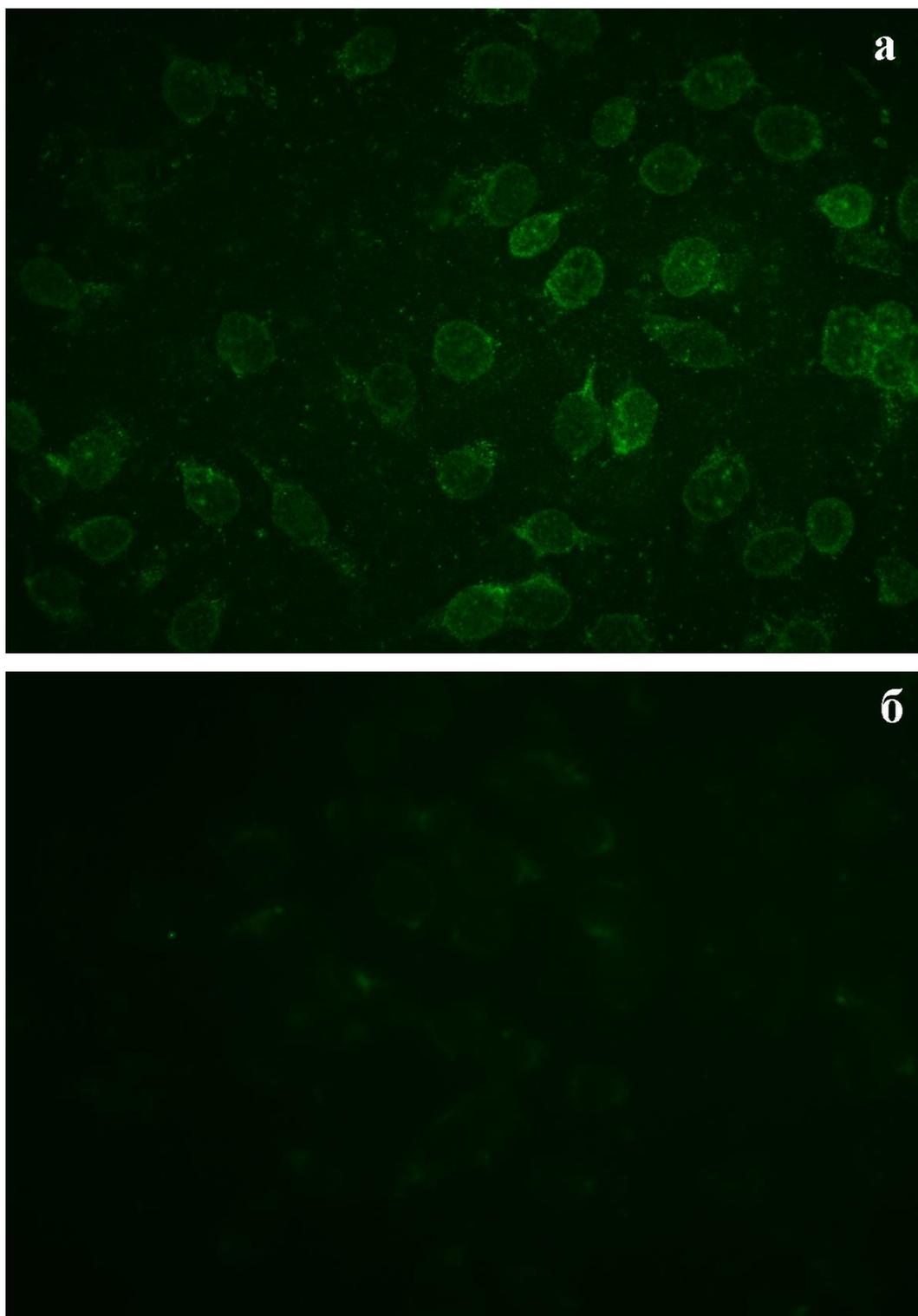


Рисунок 19 - Практически полное отсутствие VEGF-R1 в ядрах нормальных клеток ПФЧ. ИЦХ после разрушения цитоплазмы детергентом PBST. **а** - опыт: клетки обработаны первичными анти-VEGF-R1 и вторичными FITC-мечеными антителами. Увеличение x 400; **б** - отрицательный контроль: клетки обработаны только вторичными FITC-мечеными антителами. Увеличение x 400.

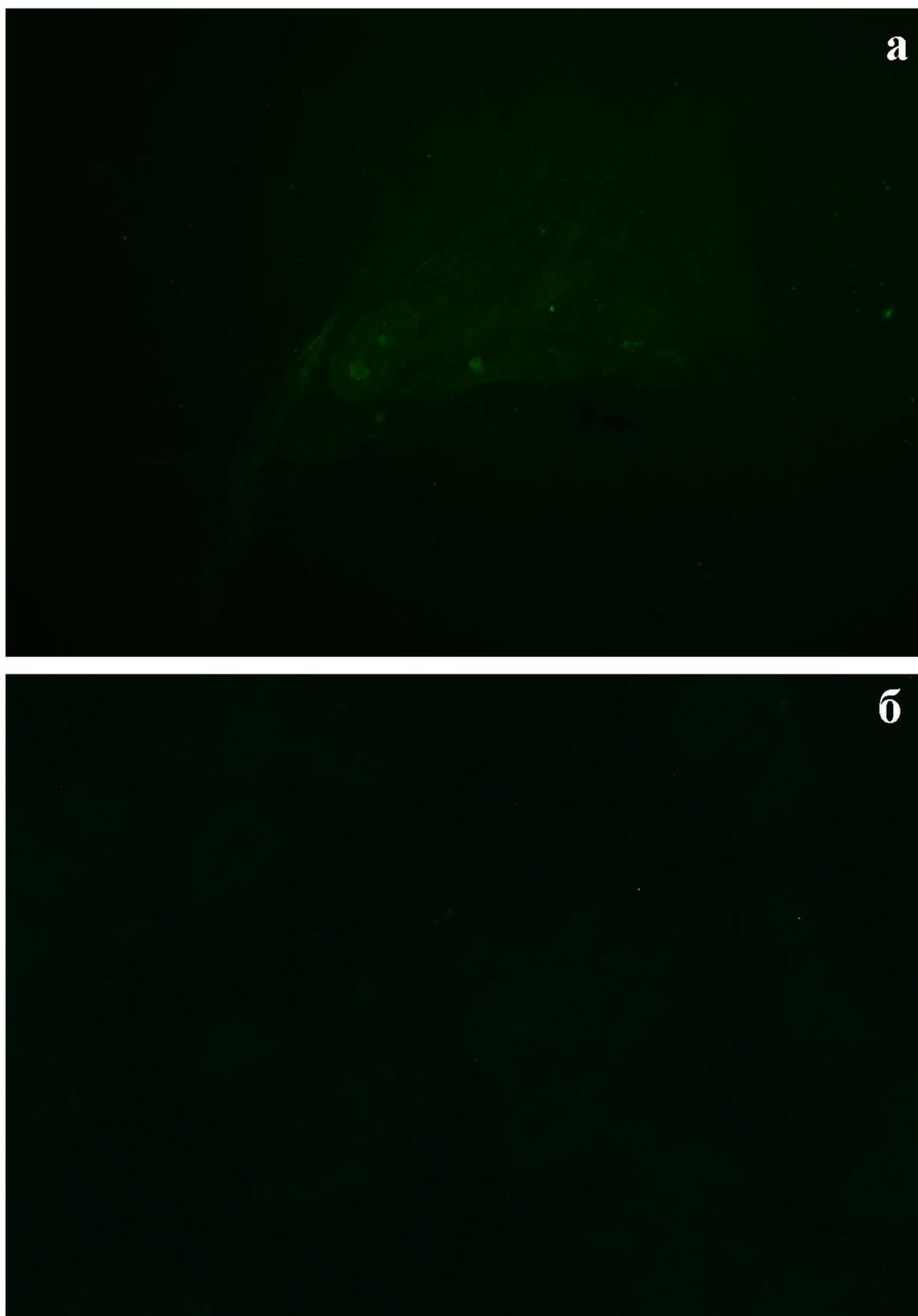


Рисунок 20 - Практически полное отсутствие VEGF-R1 в ядрах клеток H1036. ИЦХ-окрашивание после разрушения цитоплазмы детергентом PBST. **а** - опыт: клетки обработаны первичными анти-VEGF-R1 и вторичными FITC-мечеными антителами. Увеличение x 400; **б** - отрицательный контроль: клетки обработаны только вторичными FITC-мечеными антителами. Увеличение x 400.

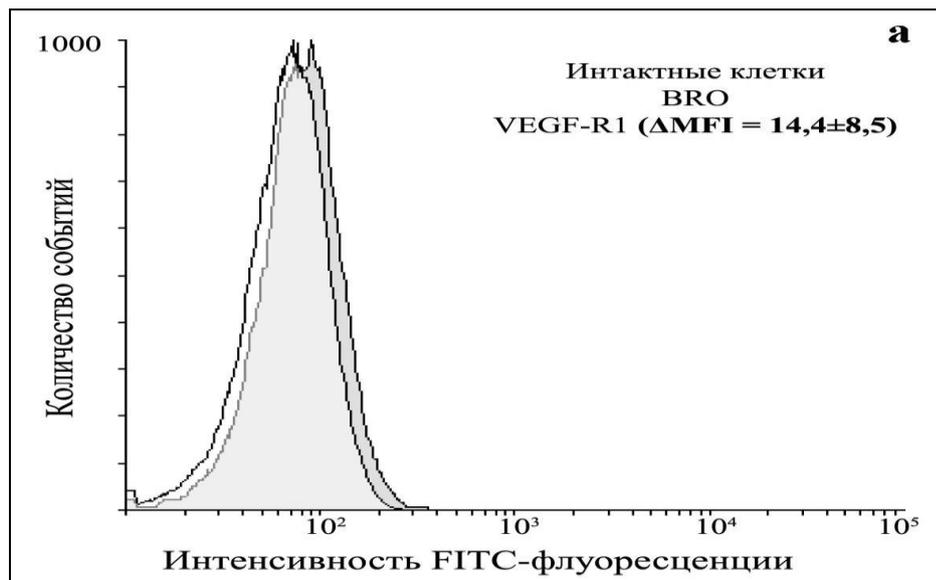
3.3. Количественная оценка содержания белка VEGF-R1 в опухолевых и нормальных клетках с помощью проточной цитометрии

Результаты ИЦХ были подтверждены и дополнены количественными данными, полученными при помощи непрямой реакции иммунофлуоресценции на проточном цитометре (РИФ). Кроме того, этот метод дал возможность чётко разграничить поверхностное, внутриклеточное и ядерное содержание белка VEGF-R1.

3.3.1. Измерение VEGF-R1 на поверхности клеток

Содержание рецептора на цитоплазматической мембране оценивали в экспериментах с интактными клетками опухолевых линий BRO и A431 и нормальной линии ПФЧ. Результаты измерений показали крайне низкие значения ΔMFI для клеток всех трёх линий, близкие к уровню отрицательного контроля: ΔMFI для BRO = $14,4 \pm 8,5$; для A431 = $21,4 \pm 9,6$; для ПФЧ = $15,8 \pm 8,2$.

На рис.21 представлены соответствующие гистограммы интенсивности флуоресценции интактных клеток. Хорошо видно, что интенсивность флуоресценции опытных и контрольных клеток практически совпадает.



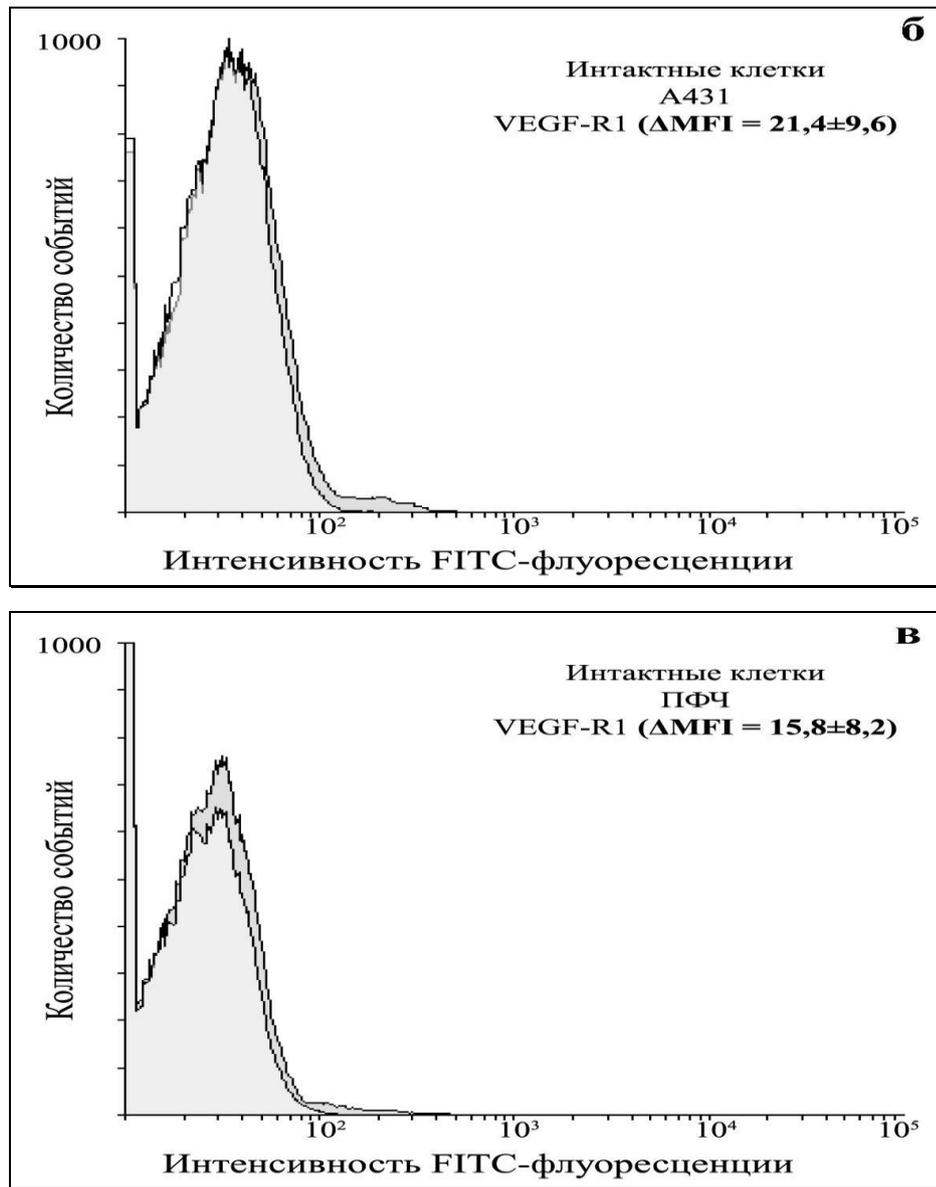


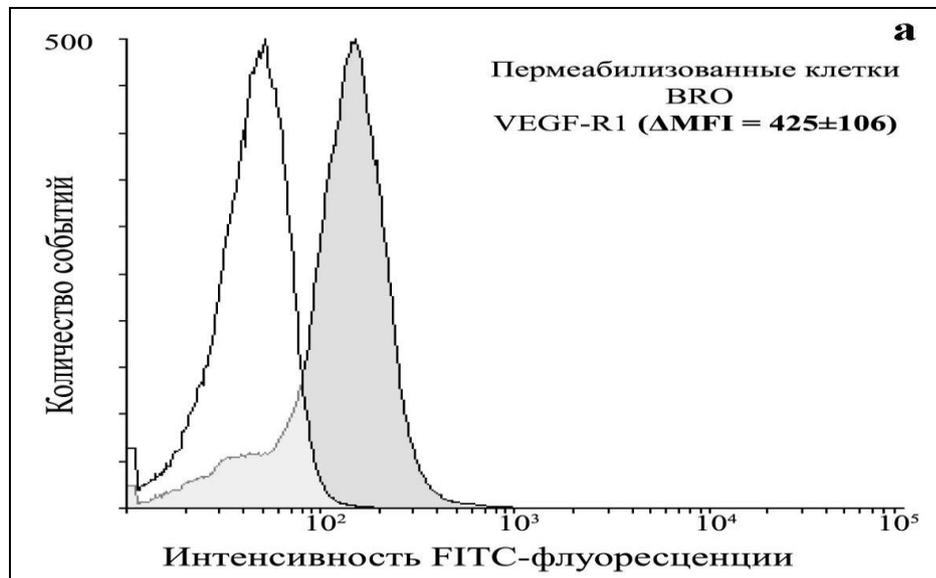
Рисунок 21 - Гистограммы интенсивности флуоресценции интактных клеток. Опыт (окраска анти-VEGF-R1 антителами) - тёмно-серый цвет. Контроль (только вторичные антитела) - белый цвет. Область наложения графиков обозначена светло-серым цветом. По оси абсцисс – интенсивность FITC-флуоресценции, по оси ординат – количество событий с данной интенсивностью флуоресцентного сигнала. **а** - интактные клетки меланомы кожи человека BRO ($\Delta\text{MFI} = 14,4 \pm 8,5$). Процент экспрессирующих VEGF-R1 клеток = $0,57 \pm 0,13\%$; **б** - интактные клетки карциномы вульвы человека А431 ($\Delta\text{MFI} = 21,4 \pm 9,6$). Процент экспрессирующих VEGF-R1 клеток = $0,37 \pm 0,25\%$; **в** - интактные нормальные клетки человека ПФЧ ($\Delta\text{MFI} = 15,8 \pm 8,2$). Процент экспрессирующих VEGF-R1 клеток = $0,58 \pm 0,22\%$.

Полученные в опытах с интактными клетками данные свидетельствуют, что на цитоплазматической мембране как опухолевых, так и нормальных клеток рецептор VEGF-R1 практически отсутствует.

3.3.2. Измерение содержания внутриклеточной фракции VEGF-R1

После обработки клеток пермеабилizующим агентом – метанолом – антителам становится доступен и внутриклеточно расположенный рецептор. В данных опытах VEGF-R1 выявлен как внутри нормальных, так и опухолевых клеток. Однако содержание внутриклеточного рецептора в нормальных ПФЧ оказалось ~ в 3 раза ниже, чем в клетках обеих опухолевых линий: ΔMFI для BRO = 425 ± 106 ; ΔMFI для A431 = 302 ± 94 ; ΔMFI для ПФЧ = 123 ± 46 .

На рис.22 представлены соответствующие гистограммы интенсивности флуоресценции пермеабилizованных клеток. Видно, что интенсивность флуоресценции опытных и контрольных клеток отличается во всех трёх линиях, однако в нормальных ПФЧ расхождение значительно меньше.



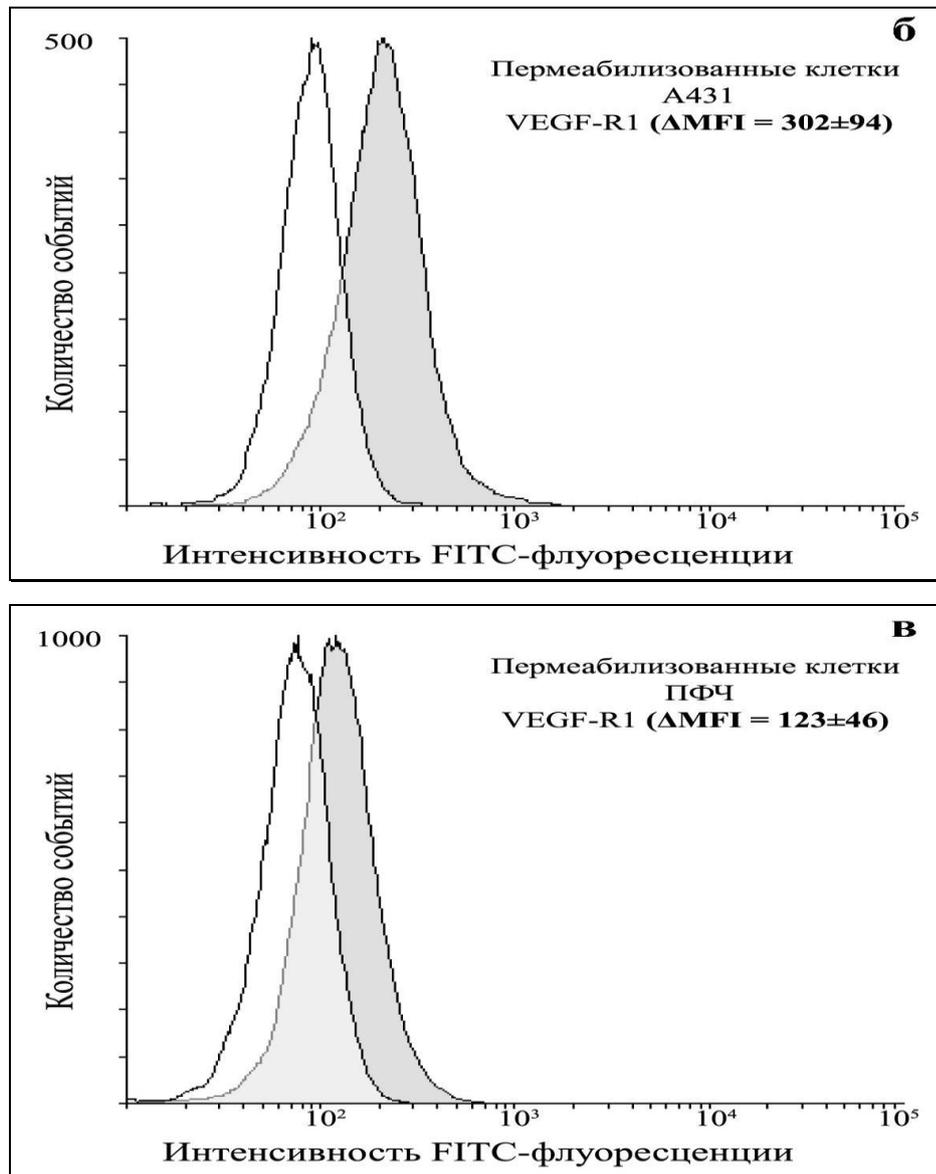


Рисунок 22 - Гистограммы интенсивности флуоресценции пермеабиллизованных клеток. Опыт (окраска анти-VEGF-R1 антителами) - тёмно-серый цвет. Контроль (только вторичные антитела) - белый цвет. Область наложения графиков обозначена светло-серым цветом. По оси абсцисс – интенсивность FITC-флуоресценции, по оси ординат – количество событий с данной интенсивностью флуоресцентного сигнала. **а** – пермеабиллизованные опухолевые клетки BRO ($\Delta\text{MFI} = 425 \pm 106$). Процент экспрессирующих VEGF-R1 клеток = $46,7 \pm 4,6\%$; **б** – пермеабиллизованные опухолевые клетки А431 ($\Delta\text{MFI} = 302 \pm 94$). Процент экспрессирующих VEGF-R1 клеток = $34,4 \pm 7,2\%$; **в** - пермеабиллизованные нормальные клетки ПФЧ ($\Delta\text{MFI} = 123 \pm 46$). Процент экспрессирующих VEGF-R1 клеток = $15 \pm 1,6\%$.

Таким образом, в то время как уровень экспрессии VEGF-R1 на поверхности опухолевых клеток не отличался от такового на нормальных и был крайне низким, внутриклеточное содержание рецептора в обеих линиях злокачественных клеток оказалось ~ в 2,5-3 раза выше, чем в фибробластах ПФЧ ($p < 0,05$).

3.3.3. Анализ содержания белка VEGF-R1 в ядрах клеток

3.3.3.1. Контроль интактности и чистоты экстрагированных ядер

Прежде чем проводить оценку уровня белка VEGF-R1 внутри ядра, нам необходимо было убедиться, что полученная ядерная суспензия состоит из неповреждённых ядер и свободна от остатков цитоплазмы, что могло бы исказить результаты измерений ядерного содержания рецептора. Для ответа на эти вопросы были исследованы цитологические препараты, приготовленные из выделенных ядер и окрашенные основным (гематоксилин, азур – на ядра) и кислым (эозин – на цитоплазму) красителями. Кроме того, методом РИФ ядерный экстракт был протестирован на отсутствие в нём цитоплазматического маркера β -тубулина. Наконец, интактность выделенных ядер оценивали на проточном цитометре по критерию сохранности в них двух специфических ядерных белков – ламина А/С и PCNA.

В мазке, приготовленном из свежей ядерной суспензии, практически не наблюдалось повреждённых и слипшихся ядер. Микроскопический анализ фиксированных и окрашенных препаратов подтвердил, во-первых, целостность ядерной оболочки, а во-вторых, отсутствие остатков цитоплазмы (рис.23).

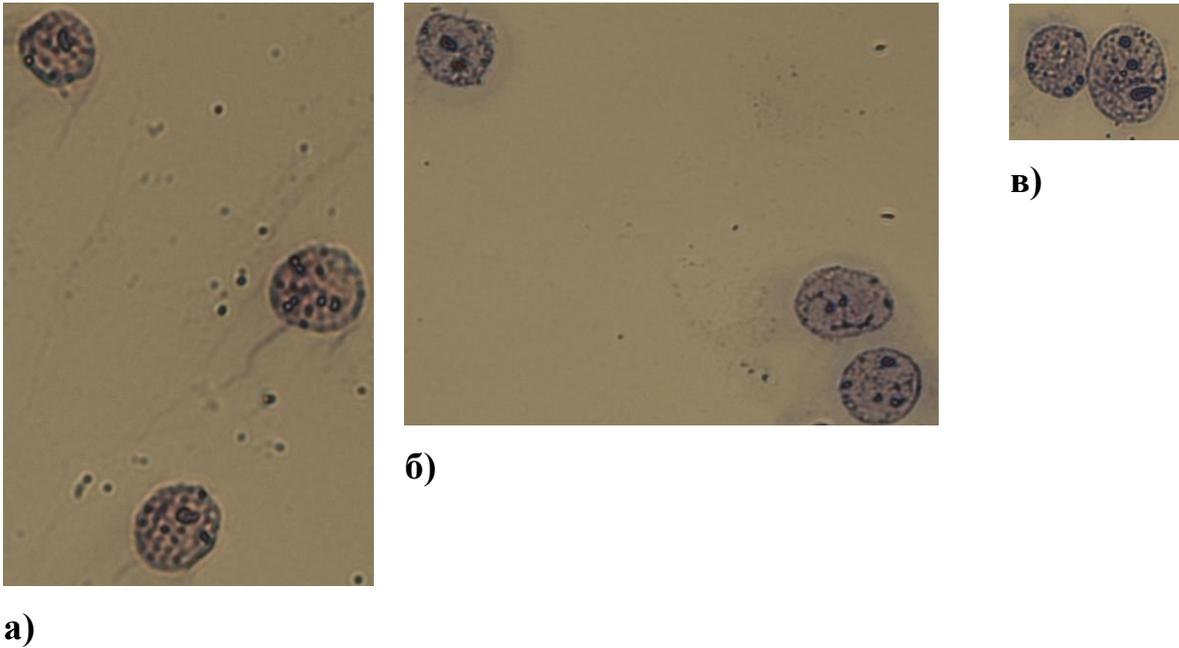


Рисунок 23 - Микрофотографии ядер, выделенных из клеток линии A431. Увеличение $\times 400$. **а** - окраска гематоксилином по Майеру. Видна неповреждённая оболочка ядра; **б, в** - окраска азур-эозином по Романовскому. Остатки цитоплазмы не выявлены, о чём свидетельствует отсутствие в препарате розовой окраски эозином.

По данным проточной цитометрии, в гейте, установленном для ядер в соответствии с гистограммой клеточного цикла, специфический цитоплазматический белок β -тубулин, практически не детектировался ($\Delta\text{MFI}=7,6\pm 2,6$) (рис.24). Важно отметить, что при смещении области измерения в сторону более высоких значений FSC и SSC, где располагаются неочищенные ядра и конгломераты, содержание β -тубулина по критерию ΔMFI составило уже ~ 250 . Данный факт ещё раз подтвердил правильность выбранного гейта: в анализируемой области графика действительно располагаются одиночные ядра без примеси цитоплазмы.

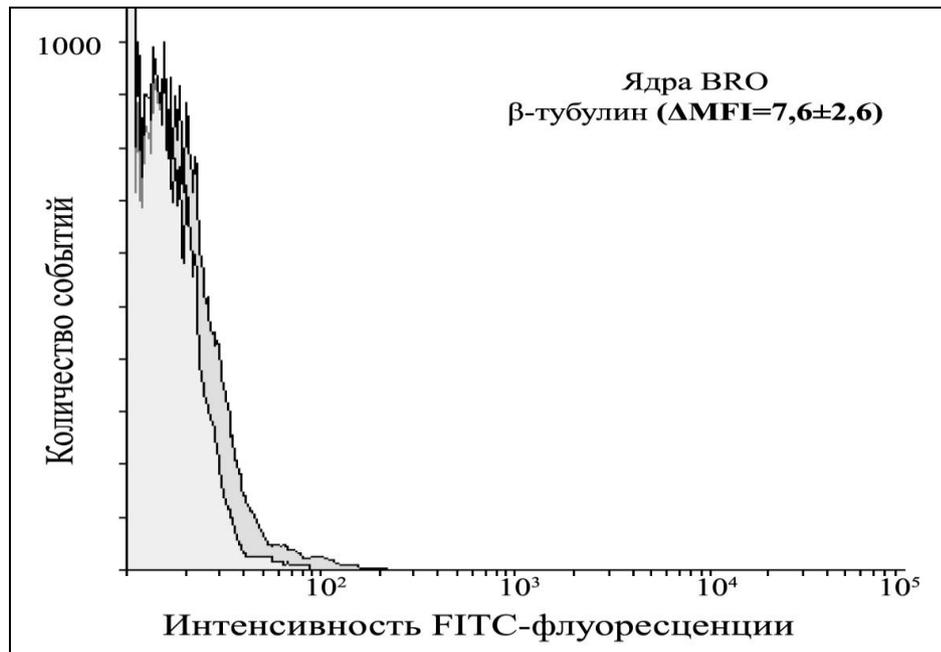


Рисунок 24 - Гистограмма интенсивности флуоресценции ядер клеток меланомы BRO. Опыт (окраска анти- β -Tub антителами) - тёмно-серый цвет. Контроль (только вторичные антитела) - белый цвет. Область наложения графиков обозначена светло-серым цветом. По оси абсцисс – интенсивность FITC-флуоресценции, по оси ординат – количество событий с данной интенсивностью флуоресцентного сигнала. β -тубулин в экстрагированных ядрах практически отсутствует ($\Delta MFI=7,6\pm 2,6$). Процент экспрессирующих β -Tub ядер = $0,82\pm 0,26\%$.

Значительный уровень специфических ядерных маркёров, PCNA и ламина A/C, составивший по критерию ΔMFI 800 ± 176 и 4109 ± 1226 соответственно, подтвердил сохранность белков в выделенных ядрах, то есть их интактность (рис.25). Кроме того, учитывая внутриядерную локализацию обоих маркёров, полученные высокие значения их содержания указывают на то, что оболочка ядра в ходе экстракции становится проницаемой для антител. Иначе говоря, дополнительной пермеабиллизации ядерной мембраны не требуется. В итоге регистрируемый показатель отражает суммарный уровень исследуемого белка снаружи и внутри ядра.

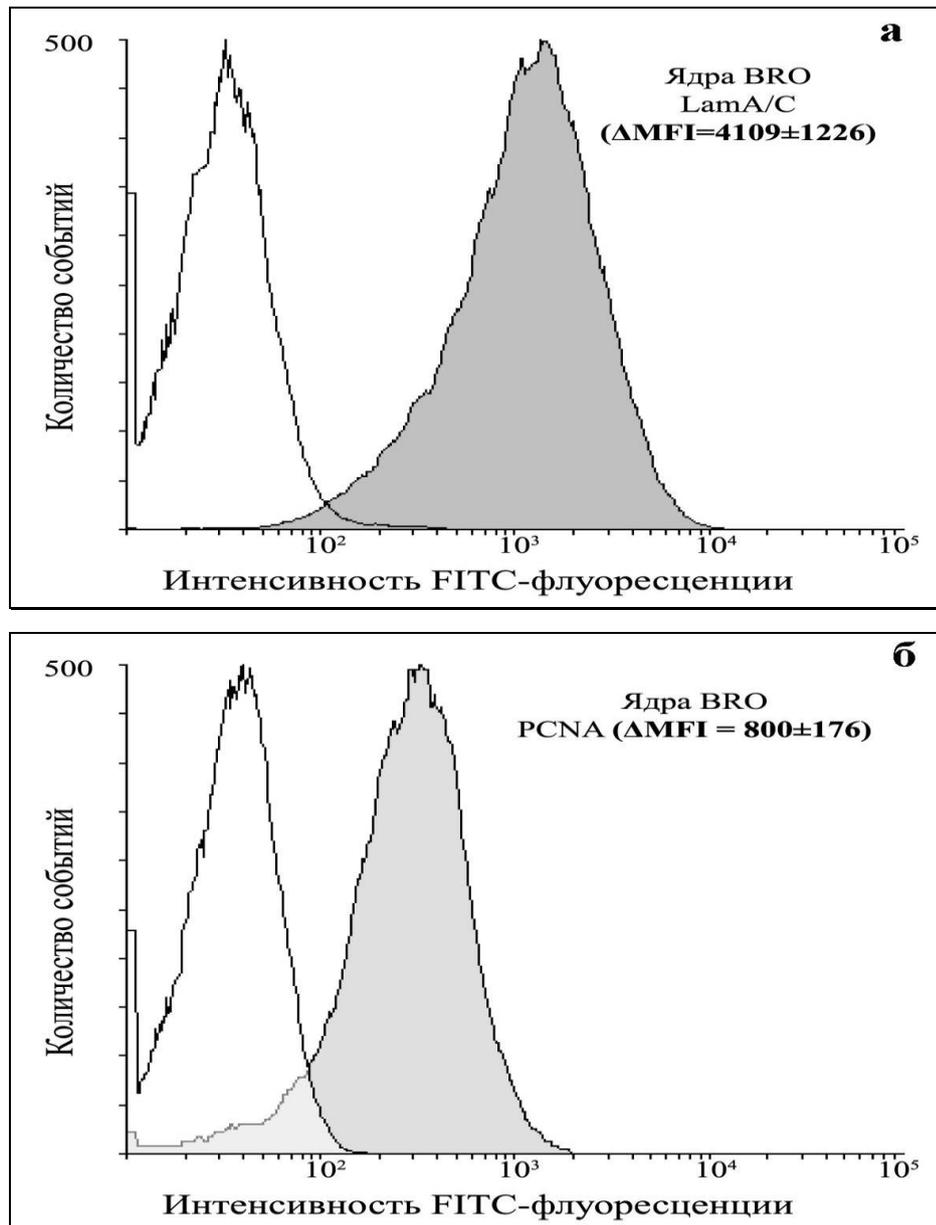
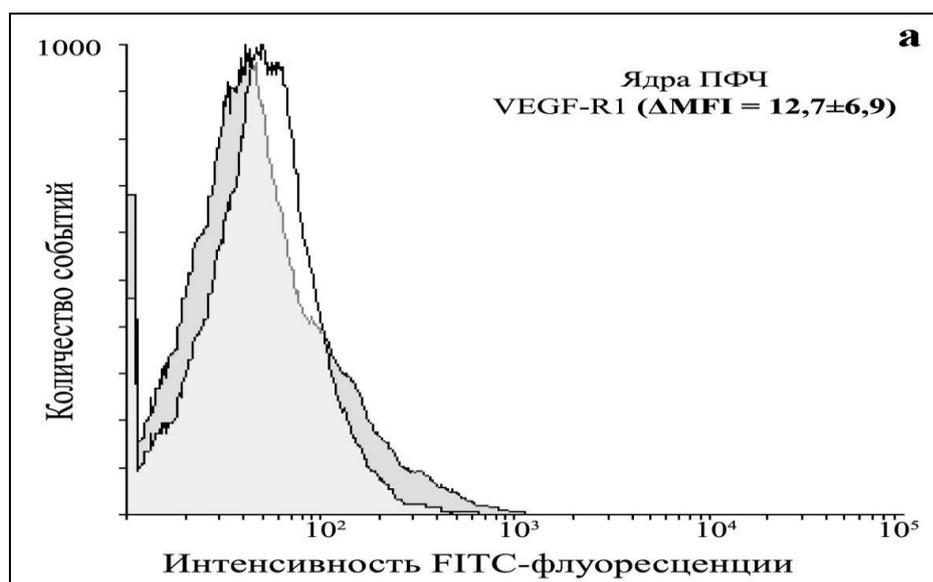


Рисунок 25 - Гистограмма интенсивности флуоресценции ядер клеток меланомы BRO. Опыт (а - окраска анти-Lam A/C и б - анти-PCNA антителами) - тёмно-серый цвет. Контроль (только вторичные антитела) - белый цвет. Область наложения графиков обозначена светло-серым цветом. По оси абсцисс – интенсивность FITC-флуоресценции, по оси ординат – количество событий с данной интенсивностью флуоресцентного сигнала. **а** - чрезвычайно высокий уровень ламина A/C ($\Delta\text{MFI} = 4109\pm1226$) в изолированных ядрах клеток меланомы BRO, окрашенных анти-Lam A/C антителами. Процент экспрессирующих Lam A/C ядер = $94,4\pm2,5\%$; **б** - высокое содержание PCNA в изолированных ядрах ($\Delta\text{MFI} = 800\pm176$) меланомы BRO, окрашенных анти-PCNA антителами. Процент экспрессирующих PCNA ядер = $81,8\pm3,1\%$.

Таким образом, проведённые контрольные эксперименты доказывают, что экстрагированные ядра полностью удовлетворяют требованиям к их качеству для дальнейшего РИФ-анализа с целью детекции в них VEGF-R1: ядерная фракция состоит из одиночных, интактных, хорошо очищенных от примесей цитоплазмы ядер.

3.3.3.2. Количественная оценка содержания VEGF-R1 в ядрах

Результаты измерений ядерного содержания VEGF-R1 на проточном цитометре подтвердили ранее полученные данные ИЦХ о присутствии рецептора в ядрах исключительно опухолевых клеток. Если количество VEGF-R1 в ядрах нормальных ПФЧ практически соответствовало уровню отрицательного контроля ($\Delta\text{MFI} = 12,7 \pm 6,9$) (рис.26а), то содержание рецептора в ядрах опухолевых клеток оказалось высоким. Так, в ядрах клеток A431 уровень VEGF-R1 по критерию ΔMFI составил 171 ± 57 (рис.26б), а в ядрах высокозлокачественных клеток меланомы BRO в 1,75 раз выше - 300 ± 59 ($p < 0,05$) (рис.26в). То есть наибольшее содержание ядерного рецептора соответствовало наиболее агрессивной опухолевой клеточной линии.



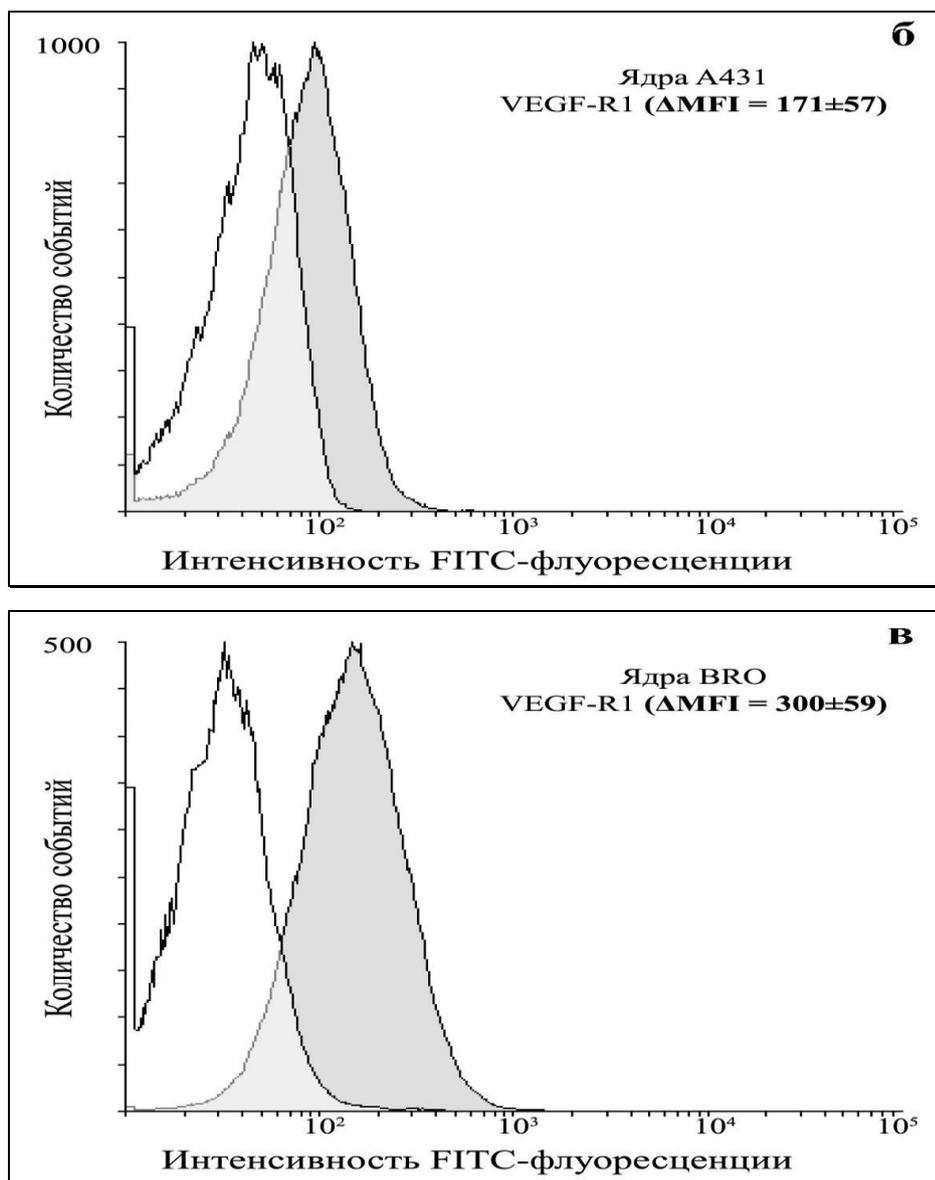


Рисунок 26 - Гистограмма интенсивности флуоресценции клеточных ядер. Опыт (окраска анти-VEGF-R1 антителами) - тёмно-серый цвет. Контроль (только вторичные антитела) - белый цвет. Область наложения графиков обозначена светло-серым цветом. **а** - отсутствие сигнала флуоресценции ядерного VEGF-R1 в нормальных фибробластах ПФЧ. Показатель ΔMFI ($12,7 \pm 6,9$) близок к уровню отрицательного контроля. Процент экспрессирующих VEGF-R1 ядер = $0,47 \pm 0,24\%$; **б** - наличие VEGF-R1 в ядрах опухолевых клеток A431 ($\Delta\text{MFI} = 171 \pm 57$). Процент экспрессирующих VEGF-R1 ядер = $24,2 \pm 7,9\%$; **в** - высокий уровень VEGF-R1 в ядрах опухолевых клеток BRO ($\Delta\text{MFI} = 300 \pm 59$). Процент экспрессирующих VEGF-R1 ядер = $42 \pm 11,7\%$.

В табл.7 и на сводном рис.27 представлены обобщённые результаты содержания VEGF-R1 в ядре, на цитоплазматической мембране и внутри нормальных и опухолевых клеток человека.

Таблица 7 – Показатели ΔMFI , отражающие уровень VEGF-R1 в ядре, на цитоплазматической мембране и внутри нормальных и опухолевых клеток человека.

| Компартмент клетки | Показатель ΔMFI (содержание VEGF-R1), $p < 0,05$ | Процент клеток/ядер с наличием экспрессии VEGF-R1, $p < 0,05$ |
|--|--|--|
| Наружная мембрана опухолевых клеток линии BRO | $14,4 \pm 8,5$ | $0,57 \pm 0,13 \%$ |
| Наружная мембрана опухолевых клеток линии A431 | $21,4 \pm 9,6$ | $0,37 \pm 0,25 \%$ |
| Наружная мембрана нормальных клеток линии ПФЧ | $15,8 \pm 8,2$ | $0,58 \pm 0,22 \%$ |
| Внутриклеточное содержание в опухолевых клетках линии BRO | 425 ± 106 | $46,7 \pm 4,55 \%$ |
| Внутриклеточное содержание в опухолевых клетках линии A431 | 302 ± 94 | $34,4 \pm 7,2 \%$ |
| Внутриклеточное содержание в нормальных клетках линии ПФЧ | 123 ± 46 | $15 \pm 1,6 \%$ |
| Ядра опухолевых клеток линии BRO | 300 ± 59 | $42 \pm 11,7 \%$ |
| Ядра опухолевых клеток линии A431 | 171 ± 57 | $24,4 \pm 7,9 \%$ |
| Ядра нормальных клеток линии ПФЧ | $12,7 \pm 6,9$ | $0,47 \pm 0,24 \%$ |

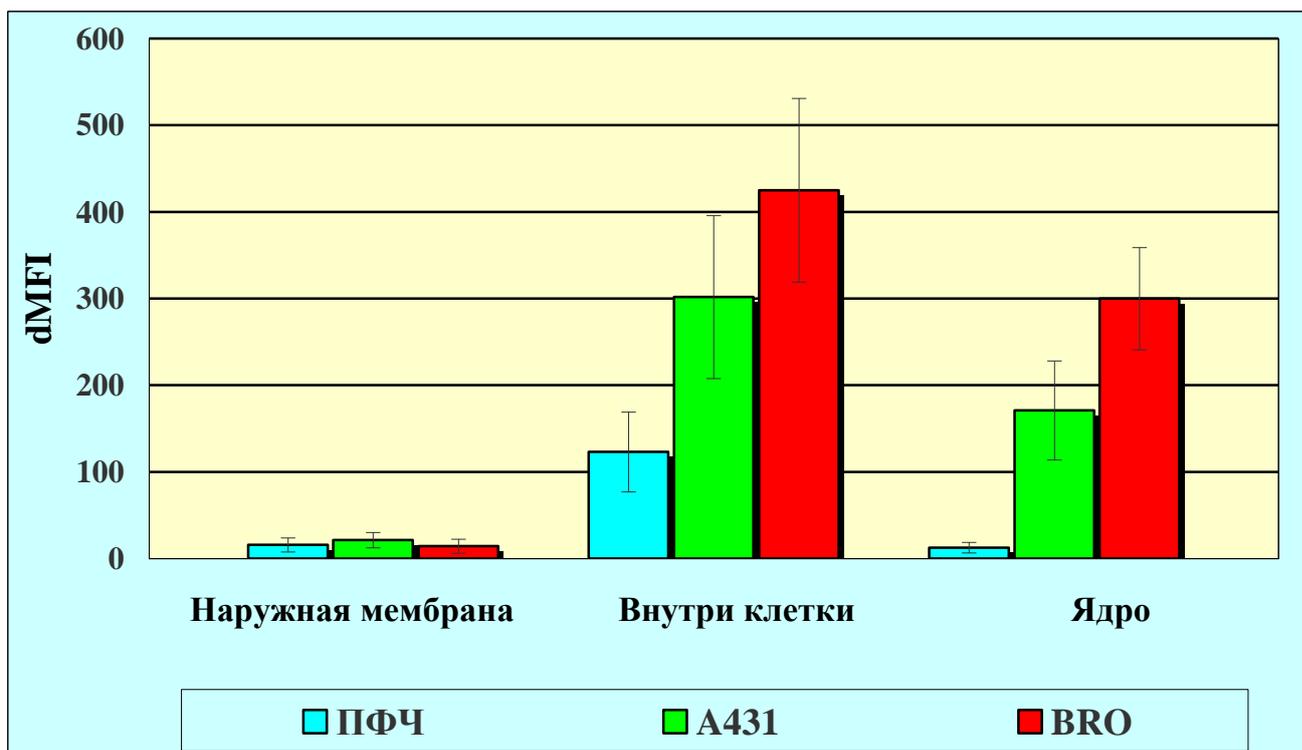


Рисунок 27 - Диаграмма содержания VEGF-R1 в нормальных (ПФЧ) и опухолевых (A431 и BRO) клетках человека по данным проточной цитометрии. По оси абсцисс - клеточные линии и компартменты клетки; по оси ординат – значения ΔMFI . ПФЧ - голубой, A431 – зелёный, BRO – красный.

Как видно на диаграмме (рис.27), высокое внутриклеточное содержание рецептора в A431 и BRO обусловлено большим количеством ядерного VEGF-R1. При этом, похоже, уровень рецептора в цитоплазме каждой клеточной линии примерно одинаков ($\Delta MFI \approx 125$).

3.3.4. Определение белка VEGF-R1 методом вестерн-блоттинга

Для оценки содержания изоформ VEGF-R1 в ядре и цитоплазме опухолевых клеток BRO и нормальных фибробластов ПФЧ применяли вестерн-блоттинг. Кроме того, этот метод позволил также подтвердить специфичность используемых в экспериментах первичных анти-VEGF-R1 антител (“R&D Systems”, США). Результаты опыта приведены на рис.28.

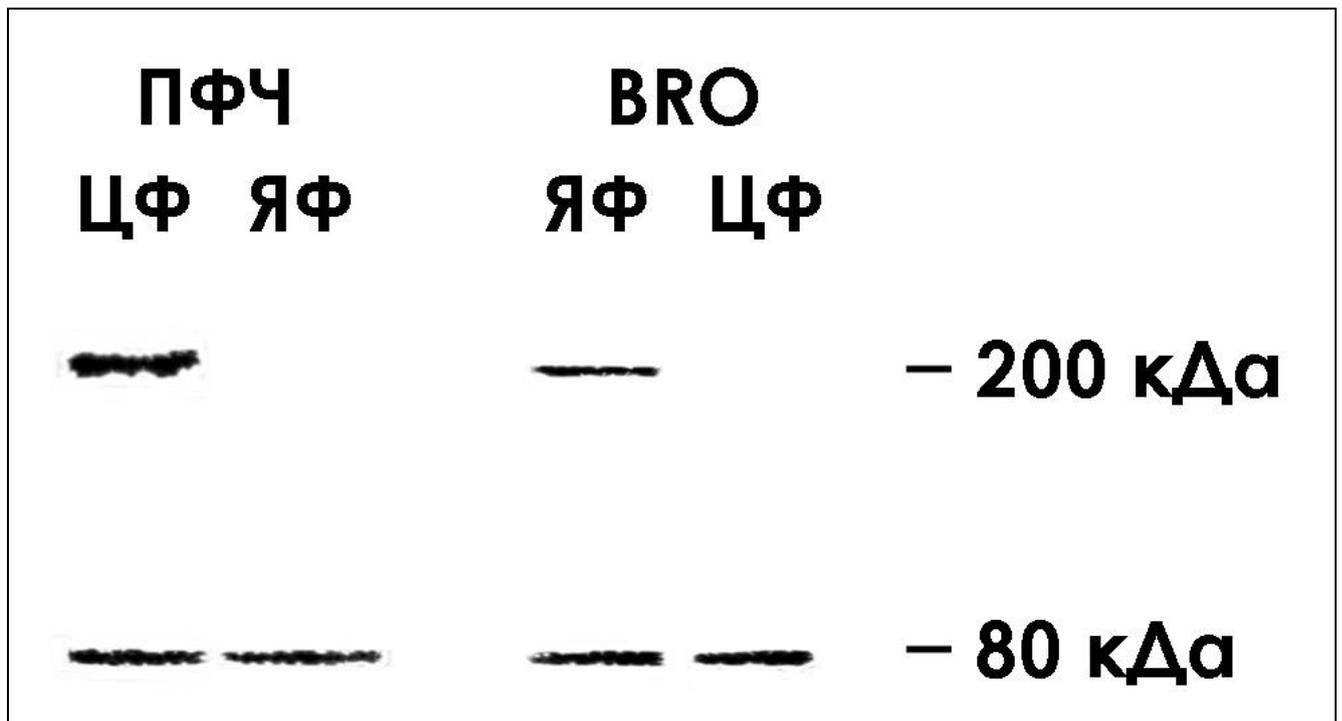


Рисунок 28 - Вестерн-блоттинг. Результаты денситометрического анализа содержания изоформ VEGF-R1 в цитоплазматическом (ЦФ) и ядерном (ЯФ) белковых лизатах опухолевых клеток BRO и нормальных клеток ПФЧ. Обработка первичными анти-VEGF-R1 антителами, узнающими как мембранно-связанную, так и растворимую изоформу рецептора, и вторичными антимышиными хемилюминесцирующими антителами. Полоса 200 кДа соответствует mVEGF-R1, а 80 кДа – sVEGF-R1.

Как видно из рисунка, растворимая изоформа рецептора sVEGF-R1 (80 кДа) обнаружена и в цитоплазме, и в ядре как опухолевых, так и нормальных клеток. Мембранно-связанная форма mVEGF-R1 (200 кДа) присутствует только в цитоплазме нормальных ПФЧ и отсутствует в их ядрах. В злокачественных клетках BRO, напротив, данная изоформа детектируется исключительно в ядерной фракции и не определяется в цитоплазматической. При этом следует отметить, что выявить mVEGF-R1 в ядрах BRO нам удалось только после их обработки ультразвуком. Поскольку это воздействие направлено в том числе и на фрагментацию ДНК, мы не исключаем, что мембранно-связанная изоформа рецептора в опухолевых клетках может быть связана с хроматином.

Таким образом, результаты вестерн-блот-анализа о присутствии mVEGF-R1 в ядрах только злокачественных клеток подтверждают данные наших опытов ИЦХ и РИФ и указывают на значимость для опухолевой клетки полноразмерной изоформы рецептора, локализованной в ядре.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью представленной работы являлась детекция и измерение содержания VEGF-R1 в различных компартментах опухолевых клеток человека. Экспрессию гена и соотношение сплайсоформ изучаемого рецептора оценивали по результатам полуколичественной ПЦР и ПЦР в режиме реального времени. Белок VEGF-R1 в клетках выявляли с помощью ИЦХ, РИФ-анализа и вестерн-блоттинга. Причём была поставлена задача измерить уровень рецептора на мембране клетки, в её цитоплазме и ядре. Эти данные смогли бы приблизить нас к пониманию механизмов действия VEGF-R1 и его роли в опухолевом росте и прогрессии, о чём до настоящего времени очень мало известно. Следует заметить, что в качестве объектов исследования мы намеренно использовали также и линии злокачественных клеток человека, в которых ранее рецептор не изучали.

Оценку экспрессии гена VEGF-R1 проводили на клетках карциномы вульвы A431, немелкоклеточного рака лёгкого A549 и карциномы почки Sn12с. По результатам ОТ-ПЦР во всех этих линиях была обнаружена мРНК рецептора, а наибольшее её количество зарегистрировано в клетках A431 (рис.11б). Ранее транскрипционная активность гена VEGF-R1 была также установлена для клеток множественной миеломы, холангиокарциномы, острого лимфобластного и миелобластного лейкоза [5,71,125,128]. Таким образом, наши результаты подтверждают предположение об экспрессии рецептора в большинстве опухолевых клеток человека и указывают на возможный вклад VEGF-R1 в процесс канцерогенеза.

Соотношение полноразмерной и растворимой (укороченной) сплайсоформ рецептора оценивали с помощью ПЦР в режиме реального времени на клетках A431. Полученные результаты показали наличие мРНК как мембранно-связанной, так и растворимой изоформы VEGF-R1, причём уровень последней оказался ~ в 1,7 раз выше (рис.12а, рис.12б; табл.6).

До настоящего времени соотношение сплайсоформ рецептора VEGF-R1 в опухолевых клетках никогда не изучали, что, скорее всего, обусловлено низким научным интересом к VEGF-R1 в онкологии. Наши данные о более высокой

экспрессии мРНК растворимой изоформы VEGF-R1 можно объяснить тем, что клетки в культуре не испытывают недостатка в кислороде и поэтому, наряду с полноразмерной, транскрибируют и растворимую сплайсоформу рецептора.

Следующим этапом исследования явилось выявление белка VEGF-R1, а также определение его клеточной локализации. По результатам ИЦХ-окрашивания рецептор отчётливо детектировался в опухолевых клетках линий A431 и BRO (рис.13, рис.14) и в значительно меньшей степени - в нормальных фибробластах ПФЧ и H1036 (рис.15, рис.16). При этом во всех них VEGF-R1 располагался внутриклеточно.

Для количественной оценки содержания рецептора в клетках использовали проточную цитометрию. Кроме того, этот метод, в отличие от ИЦХ, позволил чётко разграничить поверхностный (интактные клетки) и внутриклеточный (пермеабелизованные клетки) пул VEGF-R1. По данным РИФ, уровень рецептора на цитоплазматической мембране как опухолевых BRO и A431 (рис.21а, рис.21б), так и нормальных ПФЧ (рис.21в) был крайне низким. Напротив, внутри клеток всех 3-х линий содержание VEGF-R1 оказалось значительно выше (рис.22). При этом уровень внутриклеточного рецептора между нормальными и опухолевыми клетками отличался в разы: по критерию ΔMFI в нормальных фибробластах ПФЧ содержание VEGF-R1 было ~ в 3 раза ниже, чем в высокозлокачественных BRO, и ~ в 2,5 раза ниже, чем в A431 ($p < 0,05$).

Наши результаты о преимущественно внутриклеточной локализации VEGF-R1 расходятся с данными работ [49,109,127] и, казалось бы, противоречат традиционному представлению о поверхностном расположении тирозинкиназных рецепторов (к которым относится и -R1). Вместе с тем, в нескольких исследованиях VEGF-R1 был также выявлен именно в цитоплазме различных опухолевых клеток - рака молочной железы, толстой кишки, меланомы и миеломы человека [25,61,81,123]. Кроме того, анализ последних литературных данных показывает, что к настоящему времени всё большее число учёных всё-таки склоняется к мысли о внутриклеточном расположении рецептора. Таким образом, мы не исключаем, что цитоплазматическая локализация VEGF-R1

является одной из его характерных черт, что указывает на интракринный механизм передачи сигнала. Если это так, то тогда тирозинкиназные ингибиторы, не проникающие через наружную клеточную мембрану, а также препараты на основе моноклональных АТ будут не способны ингибировать активность рецептора. Возможно, именно интракринный путь стимуляции VEGF-R1 лигандом в какой-то мере объясняет недостаточную эффективность «антительного» Бевацизумаба.

Локализация рецептора внутри клетки сама по себе ещё не позволяет сделать однозначного вывода, в каком именно клеточном компартменте он проявляет свою функциональную активность. Возможно, цитоплазматический VEGF-R1 представляет собой просто «депо» рецептора и поэтому не играет роли в канцерогенезе. Косвенным свидетельством активности любого протеина может служить его ядерная локализация, так как в ядре присутствуют только те белки, которые имеют функциональное значение.

С целью выявления ядерной локализации VEGF-R1 в следующих опытах ИЦХ было решено дискриминировать цитозольный пул рецептора. Для этого живые клетки перед фиксацией обрабатывали детергентом Тритоном-X100. Такой подход действительно позволил нам обнаружить наличие VEGF-R1 в ядре. Причём рецептор регистрировался исключительно в ядрах опухолевых клеток и не выявлялся в ядрах нормальных (рис.17, рис.18, рис.19, рис.20).

После иммуноцитохимической визуализации VEGF-R1 в клеточных ядрах мы задались целью количественно оценить содержание ядерного рецептора. Для этого нами был разработан метод экстракции нативных, очищенных от цитоплазмы клеточных ядер, пригодных для анализа на проточном цитометре. Благодаря такому подходу, мы сумели измерить уровень ядерного VEGF-R1 и сравнить этот показатель между опухолевыми и нормальными клетками, а также между линиями злокачественных клеток различной степени агрессивности. Оказалось, что в ядрах нормальных фибробластов рецептор практически не детектировался (рис.26а), в то время как в ядрах опухолевых клеток A431 и BRO регистрировался в значительном количестве (рис.26б, рис.26в). Также было

отмечено, что наибольший уровень ядерного VEGF-R1 соответствовал более злокачественной клеточной линии: показатель $\Delta MF1$ для клеток меланомы BRO превышал таковой для A431 в 1,75 раз ($p < 0,05$). То есть обнаружена зависимость между содержанием рецептора в ядре и степенью агрессивности клеток.

Правомочность утверждения о том, что разработанным методом мы детектировали исключительно ядерный пул VEGF-R1, была подтверждена предварительными контрольными экспериментами (микроскопический анализ окрашенных ядер, тест на отсутствие цитоплазматического маркера β -тубулина, количественная оценка содержания PCNA и ламина A/C в ядерном экстракте) (рис.23, рис.24, рис.25). Их результаты не оставили у нас сомнений в том, что выделена именно чистая фракция одиночных клеточных ядер. Считаем, что по сравнению с уже существующими методиками детекции ядерных белков данный метод обладает целым рядом преимуществ, в числе которых можно отметить:

- 1) возможность с высокой точностью проводить количественную оценку содержания изучаемого белка в ядре;
- 2) способность в одном эксперименте исследовать большое количество ядер, что повышает достоверность результатов;
- 3) используемое в проточной цитометрии гейтирование позволяет анализировать интересующие белки исключительно в области одиночных, хорошо очищенных ядер;
- 4) возможность сопоставления ядерного содержания изучаемого протеина в различных клеточных линиях;
- 5) способность проводить мониторинг уровня того или иного белка в ядре до и после какого-либо воздействия.

По нашему мнению, эти несомненные достоинства разработанного метода позволяют надеяться на его широкое лабораторное применение в самом ближайшем будущем.

Для изучения распределения mVEGF-R1 и sVEGF-R1 по клеточным компартментам и ответа на вопрос, которая из изоформ рецептора ответственна за малигнизацию, применяли вестерн-блоттинг. Этим методом были отдельно

проанализированы белковые лизаты из ядер и цитоплазмы изучаемых клеток. Выяснилось, что sVEGF-R1 присутствовала и в цитоплазматической, и в ядерной фракциях как опухолевых BRO, так и нормальных ПФЧ. В свою очередь, мембранно-связанная изоформа mVEGF-R1 у злокачественных клеток детектировалась только в ядрах, а у нормальных - исключительно в цитоплазме (рис.28).

Наши результаты о ядерной локализации полноразмерного рецептора mVEGF-R1 в опухолевых клетках подтвердили ранее полученные данные Т.-Н. Lee et al. [81]. Они также при помощи вестерн-блот-анализа обнаружили высокий уровень mVEGF-R1 в ядрах клеток карциномы молочной железы и значительно меньшее её количество в ядрах нормальных эндотелиоцитов. Исходя из предположения о функциональной активности ядерных белков, полагаем, что вклад в канцерогенез должен вносить полноразмерный mVEGF-R1.

Обобщая наши результаты и литературные данные (экспрессия гена и высокое внутриклеточное содержание белка VEGF-R1 в неопластических клетках, вероятная функциональная активность рецептора благодаря присутствию в ядре), мы пришли к выводу о необходимости VEGF-R1 для жизнеобеспечения опухолевых клеток, их роста и прогрессии. В пользу этого утверждения свидетельствует также обнаруженная нами зависимость между степенью злокачественности клеток и уровнем рецептора в их ядрах. Поэтому не исключено, что в перспективе показатель содержания VEGF-R1 в ядре можно будет рассматривать в качестве прогностического маркёра в онкологии.

Чем же объяснить экспрессию гена VEGF-R1 и высокий уровень рецептора в различных неопластических клетках человека, притом что в нормальных он представлен крайне ограниченно? Среди предполагаемых причин этого феномена можно обозначить следующие:

- 1) исходная генетическая нестабильность популяции злокачественных клеток и их дедифференцировка [27,98];
- 2) нарушение эпигенетических механизмов регуляции (в том числе тотальное гипометилирование генома) с активацией ранее супрессированных генов [44,75];

3) повышенная плотность клеток в опухолевом узле, что приводит к гипоксии, стимулирующей синтез VEGF-лигандов и их рецепторов [110,127].

По нашему мнению, клетки, экспрессирующие VEGF-R1, могут получать селективное преимущество в выживании и размножении при неблагоприятных условиях и поэтому в конечном счёте становятся доминирующими в опухолевой популяции. Эта гипотеза подкрепляется и данными работы [72], где рецептор рассматривают даже в качестве маркера «стволовых» клеток неоплазмы.

Наши результаты о значительном содержании VEGF-R1 внутри клетки и его отсутствии на цитоплазматической мембране свидетельствуют об интракринном механизме стимуляции рецептора. Причём, как мы полагаем, общий высокий внутриклеточный уровень VEGF-R1 в опухолевых клетках обусловлен вкладом именно ядерного пула рецептора (рис.27; табл.7). В таком случае реализация биологических эффектов VEGF-R1 может осуществляться за счёт его взаимодействия с лигандом непосредственно в клеточном ядре.

Закономерно возникает вопрос, каким образом рецептор попадает в ядро? Ядерная транслокация VEGF-R1 может быть опосредована, например, INFS- и INTERNET-механизмами (рис.8). При этом имеются сообщения, что указанные транспортные пути регулируют перенос в ядро не только полноразмерных тирозинкиназных рецепторов, но и их фрагментов [36] (рис.9). Поэтому не исключено, что детектируемый нами ядерный VEGF-R1 может представлять собой и какую-то его частично расщеплённую форму.

Суммируя свои и литературные данные, мы предполагаем 3 возможных механизма интракринного действия VEGF-R1. Во-первых, рецептор может физически стабилизировать внутреннюю ядерную мембрану – ламину – и таким образом обеспечивать защиту опухолевой клетки от гибели [81]. Эту гипотезу выдвинули Т.-Н. Lee et al., установив ко-локализацию VEGF-R1 с ламинами – белками ядра, ответственными за организацию хроматина и препятствующими апоптозу [26].

Другим механизмом может являться активация сигнальных путей каталитическим доменом рецептора. Так, Bhattacharya R. et al. [25] показали, что

после связывания с лигандом VEGF-R1 фосфорилирует определённые белки и таким образом запускает различные внутриклеточные каскады. Однако данная теория вызывает сомнение, учитывая низкую тирозинкиназную активность рецептора. Хотя, конечно, не исключён вариант, что какие-то факторы в клеточном ядре могут блокировать репрессорную область VEGF-R1 и увеличивать его каталитический потенциал.

Со своей стороны, мы предлагаем ещё один вероятный механизм действия рецептора - активацию генной экспрессии путём белок-белковых взаимодействий с различными транскрипционными факторами. При этом такой способ может быть опосредован не только полноразмерным VEGF-R1, но и его фрагментами. В пользу этой гипотезы косвенно свидетельствуют результаты наших вестерн-блот-экспериментов: в ядрах опухолевых клеток рецептор выявлялся исключительно после обработки ядерного лизата высокочастотным ультразвуком. Поскольку это воздействие направлено в том числе и на фрагментацию ДНК, мы не исключаем, что mVEGF-R1 в неопластических клетках может быть ассоциирована с хроматином.

В отличие от опухолевых клеток, в контрольных фибробластах с помощью РИФ-анализа мы зафиксировали очень незначительное содержание рецептора и его практически полное отсутствие в ядрах. Данный факт даёт основание предполагать, что в нормальных клетках VEGF-R1 не играет такой важной роли, как в злокачественных. Отсюда следует потенциальная возможность использования рецептора в качестве новой молекулярной мишени для таргетной терапии новообразований.

Принимая во внимание внутриклеточную локализацию VEGF-R1, препараты на основе моноклональных антител не должны эффективно подавлять активность рецептора. Действенность тирозинкиназных ингибиторов, включая и проникающие через цитоплазматическую мембрану, тоже вызывает сомнения ввиду низкой каталитической активности VEGF-R1.

Согласно нашему предположению, основной вклад в канцерогенез должен вносить полноразмерный VEGF-R1 внутри ядра. Поэтому наиболее

перспективным способом ингибирования его активности представляется генно-инженерное «перепрограммирование» сплайсинга рецептора с целью подавления мембранно-связанных изоформ VEGF-R1 и одновременного компенсаторного увеличения выхода растворимых. Такой подход теоретически позволит добиться двойного эффекта. С одной стороны, антиангиогенного за счёт повышения концентрации sVEGF-R1 в опухоли, а с другой, - непосредственно противоопухолевого из-за усилившейся клеточной гибели при подавлении полноразмерного рецептора.

В этом свете возможно применение таких генно-инженерных методик, как, например, морфолино-олигонуклеотиды [90], РНК-интерференция и CRISPR-технология [94]. При этом стоит отметить, что использование первых двух способов позволит добиться лишь кратковременного эффекта, в то время как CRISPR-редактирование генома способно обеспечить длительное терапевтическое действие.

Сегодня при лечении онкозаболеваний всё большее значение приобретают мишень-направленные подходы, поэтому поиск новых кардинальных отличий между здоровой и опухолевой клеткой представляется одной из главных задач современной онкологии. Полученные нами результаты о высокой экспрессии VEGF-R1 во многих неопластических клетках и незначительном его содержании в нормальных, а также о присутствии рецептора в ядрах исключительно опухолевых клеток оправдывают выбор VEGF-R1 в качестве ещё одной перспективной мишени для таргетной терапии новообразований.

ВЫВОДЫ

1. Экспрессия гена VEGF-R1 обнаружена во всех исследованных в работе линиях опухолевых клеток человека: низкодифференцированной высокозлокачественной меланомы кожи BRO, карциномы вульвы A431, немелкоклеточного рака лёгкого A549, светлоклеточной карциномы почки Sn12с.
2. Показано, что VEGF-R1 локализован преимущественно внутри клеток – как опухолевых, так и нормальных, - а не на цитоплазматической мембране. Это указывает на интракринный механизм передачи сигнала.
3. Установлено, что содержание рецептора VEGF-R1 в злокачественных клетках выше, чем в нормальных, в 2,5-3 раза.
4. Разработан метод детекции белков в изолированных нативных клеточных ядрах на проточном цитометре. С его помощью измерено содержание VEGF-R1 в ядрах нормальных и опухолевых клеток.
5. Полноразмерная изоформа VEGF-R1 выявлена в ядрах исключительно опухолевых, но не нормальных, клеток. Поэтому её наличие и уровень в ядре предлагается рассматривать в качестве предиктора неопластической трансформации.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ИЦХ – иммуноцитохимическое окрашивание с применением флуоресцентного красителя

РИФ – реакция иммунофлуоресценции на проточном цитометре

CSF-1R – рецептор колониестимулирующего фактора роста

ECD – внеклеточный домен

EGF – эпидермальный фактор роста

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста

FGF – фактор роста фибробластов

FGFR – рецептор фактора роста фибробластов

GAPDH - глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа

HGFR (c-Met) – рецептор фактора роста гепатоцитов

hHPRT1 - гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза 1 типа

HIF – гипоксия-индуцированный фактор

ICD – внутриклеточный домен

IGF-1R – рецептор инсулиноподобного фактора роста

INFS – интегративный путь попадания в ядро рецептора фактора роста фибробластов 1 типа

INTERNET – интегративный путь транспорта белков из эндоплазматической сети в ядро

MFI – средняя интенсивность флуоресценции

NP – нейропилин

PDGF – фактор роста тромбоцитов

PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа

PlGF – плацентарный фактор роста

RTK – тирозинкиназный рецептор

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

VEGF-R1 (Flt1) – рецептор фактора роста эндотелия сосудов 1 типа

VEGF-R2 (KDR) – рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 типа

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артемина, Е. М. Роль фактора роста эндотелия сосудов в патогенезе красного плоского лишая и псориаза / Е. М. Артемина, Ю. М. Штода, Н. А. Слесаренко и др. // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2014. – Т.10. - №3. – С.539-542.
2. Борзилова, Ю. А. Уровень VEGF-A в слёзной жидкости при диабетической ретинопатии / Ю. А. Борзилова, Л. А. Болдырева, И. В. Шлык и др. // Кубанский медицинский вестник. – 2015. – Т.155. - №6. – С.16-18.
3. Бывальцев, В. А. Молекулярные аспекты ангиогенеза в глиобластомах головного мозга / В. А. Бывальцев, И. А. Степанов, Е. Г. Белых, А. И. Яруллина // Вопросы онкологии. – 2017. – Т.63. - №1. – С.19-27.
4. Герштейн, Е. С. Фактор роста эндотелия сосудов и опухоли женской репродуктивной системы. Часть 2. Рак яичников и эндометрия / Е. С. Герштейн, Д. Н. Кушлинский, И. В. Терешкина и др. // Онкогинекология. – 2015. - №2. – С.4-11.
5. Голенков, А. К. Экспрессия генов факторов роста эндотелия сосудов и их рецепторов при различных вариантах течения множественной миеломы / А. К. Голенков, А. Ф. Карамышева, И. В. Буравцова и др. // Терапевтический архив. - 2013. - №7. - С.98-102.
6. Жукова, Л. Г. Экспрессия рецепторов VEGF FLT-1 и FLK-1 на опухолевых клетках - новый фактор прогноза при местно-распространённом раке молочной железы / Л. Г. Жукова, Н. В. Жуков, М. Р. Личиницер // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2003. - Т.135. - №5. - С.562-565.
7. Заридзе, Д. Г. Канцерогенез / Под ред. Д. Г. Заридзе // М.: Медицина. – 2004. – 576 с.
8. Майбородин, И. В. Целесообразность изучения опухолевого ангиогенеза как прогностического фактора развития рака / И. В. Майбородин, С. Э. Красильников, А. Е. Козяков и др. // Новости хирургии. – 2015. – Т.23. - №3. – С.339-347.

9. Марченко, Ж. С. Роль сосудистого эндотелиального фактора роста в патогенезе ревматоидного артрита / Ж. С. Марченко, Г. В. Лукина // Научно-практическая ревматология. – 2005. – №1. – С.57-60.
10. Нефедова, Н. А. Маркёры ангиогенеза при опухолевом росте / Н. А. Нефедова, О. А. Харлова, Н. В. Данилова и др. // Архив патологии. – 2016. – №2. – С.55-62.
11. Нефедова, Н. А. Роль сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и гипоксия-индуцибельного фактора (HIF) в опухолевом ангиогенезе / Н. А. Нефедова, С. Ю. Давыдова // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №3. – С.5-18.
12. Никулицкий, С. И. Новый метод выделения чистой фракции интактных клеточных ядер для иммунофлуоресцентного анализа на проточном цитофлуориметре / С. И. Никулицкий, Е. Г. Тырсина, А. Н. Иншаков, Н. Б. Боровкова // Российский Биотерапевтический Журнал. – 2016. – Т.15. – №2. – С.76-81.
13. Тырсина, Е. Г. VEGF-R1 как потенциальная молекулярная мишень для противоопухолевой терапии / Е. Г. Тырсина, С. И. Никулицкий, А. Н. Иншаков, О. О. Рябая // Доклады Академии Наук. – 2018. – Т.478. – №2. – С.236-239.
14. Тырсина, Е. Г. Роль регуляторной VEGF/VEGF-R-системы в опухолевом ангиогенезе (обзор литературы) / Е. Г. Тырсина, С. И. Никулицкий // Онкогинекология. – 2015. – №4. – С.4-12.
15. Чехонин, В. П. Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза / В. П. Чехонин, С. А. Шеин, А. А. Корчагина, О. И. Гурина // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2012. – №2. – С.23-34.
16. Щербаков, А. М. Фактор роста эндотелия сосудов, его рецепторы и антиапоптотические белки Vcl-2 и Akt при раке молочной железы / А. М. Щербаков, Е. С. Герштейн, О. А. Анурова, Н. Е. Кушлинский // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2006. – №3. – С.63-68.

17. Aase, K. Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect / K. Aase, G. von Euler, X. Li et al. // *Circulation*. – 2001. – Vol.104. – N.3. – P.358-364.
18. Aleksic, T. Type 1 insulin-like growth factor receptor translocates to the nucleus of human tumor cells / T. Aleksic, M. M. Chitnis, O. V. Perestenko et al. // *Cancer Res*. – 2010. – Vol.70. – N.16. – P.6412-6419.
19. Andersson, M. K. Nuclear expression of FLT1 and its ligand PGF in FUS-DDIT3 carrying myxoid liposarcomas suggests the existence of an intracrine signaling loop / M. K. Andersson, M. Göransson, A. Olofsson et al. // *BMC Cancer*. – 2010. – Vol.10. – P.249.
20. Aravantinos, G. Bevacizumab in combination with chemotherapy for the treatment of advanced ovarian cancer: a systematic review / G. Aravantinos, D. Pectasides // *J. Ovarian Res*. – 2014. – Vol.7. – P.57.
21. Arrillaga-Romany, I. Antiangiogenic therapies for glioblastoma / I. Arrillaga-Romany, A. D. Norden // *CNS Oncol*. – 2014. – Vol.3. – N.5. – P.349-358.
22. Barbetti, V. Chromatin-associated CSF-1R binds to the promoter of proliferation-related genes in breast cancer cells / V. Barbetti, A. Morandi, I. Tusa et al. // *Oncogene*. – 2014. – Vol.33. – N.34. – P.4359-4364.
23. Barleon, B. Mapping of the sites for ligand binding and receptor dimerization at the extracellular domain of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1 / B. Barleon, F. Totzke, C. Herzog et al. // *J. Biol. Chem*. – 1997. – Vol.272. – N.16. – P.10382-10388.
24. Bellomo, D. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia / D. Bellomo, J. P. Headrick, G. U. Silins et al. // *Circ. Res*. – 2000. – Vol.86. – N.2. – P.29-35.
25. Bhattacharya, R. Intracrine VEGF Signaling Mediates the Activity of Prosurvival Pathways in Human Colorectal Cancer Cells / R. Bhattacharya, X. C. Ye, R. Wang et al. // *Cancer Res*. – 2016. - Vol.76. – N.10. – P.3014-3024.

- 26.** Broers, J. L. The role of the nuclear lamina in cancer and apoptosis / J. L. Broers, F. C. Ramaekers // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2014. – Vol.773. – P.27-48.
- 27.** Burrell, R. A. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution / R. A. Burrell, N. McGranahan, J. Bartek et al. // *Nature.* – 2013. – Vol.501. – N.7467. – P.338-345.
- 28.** Cai, J. Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1 / J. Cai, W. G. Jiang, M. B. Grant et al. // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol.281. – N.6. – P.3604-3613.
- 29.** Carmeliet, P. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele / P. Carmeliet, V. Ferreira, G. Breier et al. // *Nature.* – 1996. – Vol.380. – N.6573. – P.435-439.
- 30.** Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease / P. Carmeliet // *Nat. Med.* - 2003. - Vol.9. - P.653–660.
- 31.** Catena, R. VEGF_{121b} and VEGF_{165b} are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A / R. Catena, L. Larzabal, M. Larrayoz et al. // *Mol. Cancer.* – 2010. – Vol.9. – P.320.
- 32.** Charnock-Jones, D. S. Placental hypoxia, endoplasmic reticulum stress and maternal endothelial sensitisation by sFLT1 in pre-eclampsia / D. S. Charnock-Jones // *J. Reprod. Immunol.* – 2016. - Vol.114. – P.81-85.
- 33.** Chau, K. Placental growth factor and pre-eclampsia / K. Chau, A. Hennessy, A. Makris // *J. Hum. Hypertens.* – 2017. – Vol.31. – N.12. – P.782-786.
- 34.** Chen, D. The efficacy of pemetrexed and bevacizumab intrapleural injection for malignant pleural mesothelioma-mediated malignant pleural effusion / D. Chen, X. Li, H. Zhao et al. // *Indian J. Cancer.* – 2014. – Vol.51. – P.82-85.
- 35.** Chen, H. VEGF, VEGFRs expressions and activated STATs in ovarian epithelial carcinoma / H. Chen, D. Ye, X. Xie et al. // *Gynecol. Oncol.* – 2004. – Vol.94. – N.3. – P.630-635.

- 36.** Chen, M. K. Proteolytic cleavage, trafficking, and functions of nuclear receptor tyrosine kinases / M. K. Chen, M. C. Hung // *FEBS J.* – 2015. – Vol.282. – N.19. – P.3693-3721.
- 37.** Christoffersson, G. VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue / G. Christoffersson, E. Vågesjö, J. Vandooren et al. // *Blood.* – 2012. – Vol.120. - N.23. – P.4653-4662.
- 38.** Cöl-Madendag, I. The role of VEGF and its receptors in the etiology of early pregnancy loss / I. Cöl-Madendag, Y. Madendag, S. Altinkaya et al. // *Gynecol. Endocrinol.* – 2014. – Vol.30. – N.2. – P.153-156.
- 39.** Cross, M. J. VEGF-receptor signal transduction / M. J. Cross, J. Dixelius, T. Matsumoto et al. // *Trends Biochem. Sci.* – 2003. – Vol.28. – N.9. – P.488-494.
- 40.** Cudmore, M. J. The role of heterodimerization between VEGFR-1 and VEGFR-2 in the regulation of endothelial cell homeostasis / M. J. Cudmore, P. W. Hewett, S. A. Ahmad et al. // *Nature Comm.* - 2012. - Vol.3. – N.7. - P.972–984.
- 41.** Dales, J. Prediction of metastasis risk (11 year follow-up) using VEGF-R1, VEGF-R2, Tie-2/Tek and CD105 expression in breast cancer (n=905) / J. Dales, S. Garcia, S. Carpentier et al. // *Br. J. Cancer.* - 2004. – Vol.90. – N.6. - P.1216-1221.
- 42.** Dales, J. Prognostic significance of VEGF receptors, VEGF-R1 (Flt-1) and VEGF-R2 (KDR/Flk-1) in breast carcinoma / J. Dales, S. Garcia, P. Bonnier et al. // *Ann. Pathol.* - 2003. – Vol.23. – N.4. - P.297-305.
- 43.** Damert, A. Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in a Rat Glioma Is Conferred by Two Distinct Hypoxia-driven Mechanisms / A. Damert, M. Machein, G. Breier et al. // *Cancer Res.* – 1997. – Vol.57. – N.17. – P.3860-3864.
- 44.** Delpu, Y. DNA methylation and cancer diagnosis / Y. Delpu, P. Cordelier, W. C. Cho et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol.14. – N.7. – P.15029-15058.
- 45.** Đorđević, G. Hypoxia inducible factor-1 α correlates with vascular endothelial growth factor A and C indicating worse prognosis in clear cell renal cell

carcinoma / G. Đorđević, K. Matušan-Ilijaš, E. Babarović et al. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* - 2009. - Vol.28. - P.40-51.

46. Eggert, A. High-level expression of angiogenic factors is associated with advanced tumor stage in human neuroblastomas / A. Eggert, N. Ikegaki, J. Kwiatkowski et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2000. – Vol.6. – N.5. – P.1900-1908.

47. Eremina, V. VEGF Inhibition and Renal Thrombotic Microangiopathy / V. Eremina, J. A. Jefferson, J. Kowalewska et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2008. – Vol.358. – N.11. – P.1129–1136.

48. Falk, T. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) is up-regulated and exogenous VEGF-B is neuroprotective in a culture model of Parkinson's disease / T. Falk, S. Zhang, S. J. Sherman // *Mol. Neurodegener.* – 2009. – Vol.4. – P.49.

49. Fan, F. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells / F. Fan, J. S. Wey, M. F. McCarty et al. // *Oncogene.* – 2005. – Vol.24. - N.16. – P.2647-2653.

50. Ferrara, N. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells / N. Ferrara, W. J. Henzel // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1989. – Vol.161. – N.2. – P.851-858.

51. Fischer, C. Flt1 and its ligands VEGF-B and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? / C. Fischer, M. Mazzone, B. Jonckx et al. // *Nat. Rev. Cancer.* - 2008. - Vol.8. - P.942–956.

52. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications / J. Folkman. // *N. Engl. Med.* – 1971. - Vol.285. - P.1182-1186.

53. Fong, G. H. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium / G. H. Fong, J. Rossant, M. Gertsenstein et al. // *Nature.* – 1995. – Vol.376. – N.6535. – P.66-70.

54. Fons, P. VEGF-R2 and neuropilin-1 are involved in VEGF-A-induced differentiation of human bone marrow progenitor cells / P. Fons, J. P. Herault, N. Delesque et al. // *J. Cell Physiol.* – 2004. – Vol.200. – N.3. – P.351-359.

- 55.** Fuh, G. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor / G. Fuh, B. Li, C. Crowley et al. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol.273. – N.18. – P.11197-11204.
- 56.** Fujii, T. Vascular invasion, but not lymphatic invasion, of the primary tumor is a strong prognostic factor in patients with colorectal cancer / T. Fujii, R. Yajima, T. Hirakata et al. // *Anticancer Res.* - 2014. - Vol.34. – N.3. - P.47-51.
- 57.** Fujiwara, S. The localization of HER4 intracellular domain and expression of its alternately-spliced isoforms have prognostic significance in ER+ HER2- breast cancer / S. Fujiwara, M. Hung, C. M. Yamamoto-Ibusuk et al. // *Oncotarget.* – 2014. – Vol.5. – N.11. – P.3919-3930.
- 58.** Galland, F. Chromosomal localization of FLT4, a novel receptor-type tyrosine kinase gene / F. Galland, A. Karamysheva, M. G. Mattei et al. // *Genomics.* – 1992. – Vol.13. – N.2. – P.475-478.
- 59.** Gille, H. A repressor sequence in the juxtamembrane domain of Flt-1 (VEGFR-1) constitutively inhibits vascular endothelial growth factor-dependent phosphatidylinositol 3'-kinase activation and endothelial cell migration / H. Gille, J. Kowalski, L. Yu et al. // *EMBO J.* – 2000. – Vol.19. – N.15. – P.4064-4073.
- 60.** Gomes, D. A. c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals / D. A. Gomes, M. A. Rodrigues, M. F. Leite et al. // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol.283. – N.7. – P.4344-4351.
- 61.** Graells, J. Overproduction of VEGF concomitantly expressed with its receptors promotes growth and survival of melanoma cells through MAPK and PI3K signaling / J. Graells, A. Vinyals, A. Figueras et al. // *J. Invest. Dermatol.* – 2004. – Vol.123. – N.6. – P.1151-1161.
- 62.** Graness, S. Protein-tyrosine-phosphatase-mediated epidermal growth factor (EGF) receptor transinactivation and EGF receptor-independent stimulation of mitogen-activated protein kinase by bradykinin in A431 cells / A. Graness, S. Hanke, F. D. Boehmer et al. // *Biochem. J.* – 2000. – Vol.347. – Pt.2. – P.441-447.

- 63.** Gruson, D. Sflt-1 in heart failure: relation with disease severity and biomarkers / D. Gruson, M. P. Hermans, B. Ferracin et al. // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 2016. – Vol.76. – N.5. – P.411-416.
- 64.** Guarneri, V. Bevacizumab and osteonecrosis of the jaw: incidence and association with bisphosphonate therapy in three large prospective trials in advanced breast cancer / V. Guarneri, D. Miles, N. Robert et al. // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2010. – Vol.122. – N.1. – P.181-188.
- 65.** Guidi, A. J. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in patients with ductal carcinoma in situ of the breast / A. J. Guidi, S. J. Schnitt, L. Fischer et al. // *Cancer.* - 1997. – Vol.80. – N.10. - P.1945-1953.
- 66.** Herold-Mende, C. Expression and functional significance of vascular endothelial growth factor receptors in human tumor cells / C. Herold-Mende, H. H. Steiner, T. Andl // *Lab. Invest.* – 1999. – Vol.79. – N.12. – P.1573-1582.
- 67.** Heydarian, M. Novel splice variants of sFlt1 are upregulated in Preeclampsia / M. Heydarian, T. McCaffrey, L. Florea et al. // *Placenta.* – 2009. – Vol.30. – N.3. – P.250-255.
- 68.** Hiratsuka, S. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice / S. Hiratsuka, O. Minowa, J. Kuno et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1998. – Vol.95. – N.16. – P.9349-9354.
- 69.** Hiratsuka, S. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis / S. Hiratsuka, Y. Maru, A. Okada et al. // *Cancer Res.* – 2001. – Vol.61. – N.3. – P.1207-1213.
- 70.** Hiratsuka, S. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis / S. Hiratsuka, K. Nakamura, S. Iwai et al. // *Cancer Cell.* – 2002. – Vol.2. – N.4. – P.289-300.
- 71.** Hoffmann, A. C. EGFR, FLT1 and heparanase as markers identifying patients at risk of short survival in cholangiocarcinoma / A. C. Hoffmann, E. Goekkurt, P. V. Danenberg et al. // *PLoS One.* – 2013. – Vol.8. – N.5. – P.e64186.

- 72.** Huang, Y. Flt-1-positive cells are cancer-stem like cells in colorectal carcinoma / Y. Huang, Y. Huang, D. Liu et al. // *Oncotarget*. – 2017. – Vol.8. – N.44. – P.76375-76384.
- 73.** Husse, S. Predictive value of the sFlt1/PlGF ratio for the diagnosis of preeclampsia in high-risk patients / S. Husse, A. Gottschlich, S. Schrey et al. // *Z. Geburtshilfe Neonatol.* – 2014. – Vol.218. – N.1. – P.34-41.
- 74.** Inan, S. Immunolocalizations of VEGF, its receptors flt-1, KDR and TGF-beta's in epithelial ovarian tumors / S. Inan, S. Vatansever, C. Celik-Ozenci et al. // *Histol. Histopathol.* – 2006. – Vol.21. – N.10. – P.1055-1064.
- 75.** Kanwal, R. Cancer epigenetics: an introduction / R. Kanwal, K. Gupta, S. Gupta // *Methods Mol. Biol.* – 2015. – Vol.1238. – P.3-25.
- 76.** Kaplan, R. N. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche / R. N. Kaplan, R. D. Riba, S. Zacharoulis et al. // *Nature*. – 2005. – Vol.438. – N.7069. – P.820-827.
- 77.** Karkkainen, M. J. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis / M. J. Karkkainen, T. V. Petrova // *Oncogene*. – 2000. – Vol.19. – N.49. – P.5598-5605.
- 78.** Koukourakis, G. V. Targeted therapy with bevacizumab (Avastin) for metastatic colorectal cancer / G. V. Koukourakis, A. Sotiropoulou-Lontou // *Clin. Transl. Oncol.* – 2011. – Vol.13. – N.10. – P.710-714.
- 79.** Lee, J. H. Effects of VEGF and FGF-2 on proliferation and differentiation of human periodontal ligament stem cells / J. H. Lee, S. Um, J. H. Jang et al. // *Cell Tissue Res.* – 2012. – Vol.348. – N.3. – P.475-484.
- 80.** Lee, J. M. Interleukin-1 β induces angiogenesis and innervation in human intervertebral disc degeneration / J. M. Lee, J. Y. Song, M. Baek et al. // *J. Orthop. Res.* – 2011. – Vol.29. – N.2. – P.265-269.
- 81.** Lee, T.-H. Vascular Endothelial Growth Factor Mediates Intracrine Survival in Human Breast Carcinoma Cells through Internally Expressed VEGFR1/FLT1 / T.-H. Lee, S. Seng, M. Sekine et al. // *PLoS Med.* – 2007. – Vol.4. – N.6. – P.1001-1016.

- 82.** Li, Y. VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1-mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats / Y. Li, F. Zhang, N. Nagai et al. // *J. Clin. Invest.* – 2008. – Vol.118. – N.3. – P.913-923.
- 83.** Lieber, M. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells / M. Lieber, B. Smith, A. Szakal et al. // *Int. J. Cancer.* – 1976. – Vol.17. – N.1. – P.62-70.
- 84.** Lin, S. Y. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor / S. Y. Lin, K. Makino, W. Xia et al. // *Nat. Cell. Biol.* – 2001. – Vol.3. – N.9. – P.802-808.
- 85.** Liu, G. Vascular endothelial growth factor B coordinates metastasis of non-small cell lung cancer / G. Liu, S. Xu, F. Jiao et al. // *Tumour Biol.* – 2015. – Vol.36. – N.3. – P.2185-2191.
- 86.** Liu, Y. Hypoxia Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression in Endothelial Cells / Y. Liu, S. R. Cox, T. Morita et al. // *Circ. Res.* – 1995. – Vol.77. – N.3. – P.638-643.
- 87.** Lockshin, A. Exceptional lethality for nude mice of cells derived from a primary human melanoma / A. Lockshin, B. C. Giovanella, P. D. De Ipolyi et al. // *Cancer Res.* – 1985. – Vol.45. – N.1. – P.345-350.
- 88.** Murakami, M. VEGFR1 tyrosine kinase signaling promotes lymphangiogenesis as well as angiogenesis indirectly via macrophage recruitment / M. Murakami, Y. Zheng, M. Hirashima et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008. – Vol.28. – N.4. – P.658-664.
- 89.** Naito, S. Evidence for metastatic heterogeneity of human renal cell carcinoma / S. Naito, S. M. Walker, A. C. von Eschenbach et al. // *Anticancer Res.* – 1988. – Vol.8. – N.6. – P.1163-1167.
- 90.** Owen, L. A. Morpholino-mediated increase in soluble Flt-1 expression results in decreased ocular and tumor neovascularization / L. A. Owen, H. Uehara, J. Cahoon et al. // *PLoS One.* – 2012. – Vol.7. – N.3. – P.e33576.
- 91.** Park, K. Vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1) tyrosine kinase signaling facilitates granulation tissue formation with recruitment of VEGFR1+

cells from bone marrow / K. Park, H. Amano, Y. Ito et al. // *Anat. Sci. Int.* – 2017. – Vol.93. – N.3. – P.372-383.

92. Poesen, K. Novel role for vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 and its ligand VEGF-B in motor neuron degeneration / K. Poesen, D. Lambrechts, P. Van Damme et al. // *J. Neurosci.* – 2008. – Vol.28. – N.42. – P.10451-10459.

93. Presta, L. G. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders / L. G. Presta, H. Chen, S. J. O'Connor et al. // *Cancer Res.* – 1997. – Vol. 57. – N.20 – P.4593-4599.

94. Ran, F. A. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system / F. A. Ran, P. D. Hsu, J. Wright et al. // *Nature Protoc.* – 2013. – Vol.8. – N.11. – P.2281-2308.

95. Sakamoto, H. Vascular Endothelial Growth Factor is an Autocrine Growth Factor for Cardiac Myxoma Cells / H. Sakamoto, T. Sakamaki, T. Kanda et al. // *Circ. J.* – 2004. – Vol.68. – N.5. – P.488-493.

96. Saleh, L. Angiogenic Markers Predict Pregnancy Complications and Prolongation in Preeclampsia: Continuous Versus Cutoff Values / L. Saleh, Y. Vergouwe, A. H. van den Meiracker et al. // *Hypertension.* – 2017. – Vol.70. – N.5. – P.1025-1033.

97. Schlaeppli, J. M. Targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) for anti-tumor therapy, by anti-VEGF neutralizing monoclonal antibodies or by VEGF receptor tyrosine-kinase inhibitors / J. M. Schlaeppli, J. M. Wood // *Cancer Metastasis Rev.* – 1999. – Vol.18. – N.4 – P.473-481.

98. Schmitt, M. V. Implications of genetic heterogeneity in cancer / M. V. Schmitt, M. J. Prindle, L. A. Loeb // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2012. – Vol.1267. – P.110-116.

99. Sela, S. A novel human-specific soluble vascular endothelial growth factor receptor 1: cell-type-specific splicing and implications to vascular endothelial growth factor homeostasis and Preeclampsia / S. Sela, A. Itin, S. Natanson-Yaron et al. // *Circ. Res.* – 2008. – Vol.102. – N.12. – P.1566-1574.

100. Senger, D. R. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid / D. R. Senger, S. J. Galli, A. M. Dvorak et al. // *Science*. – 1983. – Vol.219. – N.4587. – P.983-985.

101. Shalaby, F. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice / F. Shalaby, J. Rossant, T. P. Yamaguchi et al. // *Nature*. – 1995. – Vol.376. – N.6535. – P.62-66.

102. Shi, Y. Suppression of vascular endothelial growth factor abrogates the immunosuppressive capability of murine gastric cancer cells and elicits antitumor immunity / Y. Shi, P. Yu, D. Zeng et al. // *FEBS J*. – 2014. – Vol.281. – N.17. – P.3882-3893.

103. Shibuya, M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis / M. Shibuya // *J. Biochem. Mol. Biol*. – 2006. – Vol.39. – N.5. – P.469-478.

104. Shibuya, M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family / M. Shibuya, S. Yamaguchi, A. Yamane et al. // *Oncogene*. – 1990. – Vol.5. – N.4. – P.519-524.

105. Stachowiak, M. K. Integrative nuclear FGFR1 signaling (INFS) as a part of a universal "feed-forward-and-gate" signaling module that controls cell growth and differentiation / M. K. Stachowiak, X. Fang, J. M. Myers et al. // *J. Cell Biochem*. – 2003. – Vol.90. – N.4. – P.662-691.

106. Stachowiak, M. K. Integrative nuclear signaling in cell development - a role for FGF receptor-1 / M. K. Stachowiak, P. A. Maher, E. K. Stachowiak // *DNA Cell Biol*. – 2007. – Vol.26. – N.12. – P.811-826.

107. Stutfeld, E. Structure and function of VEGF receptors / E. Stutfeld, K. Ballmer-Hofer // *UBMB Life*. – 2009. – Vol.61. – N.9. – P.915-922.

108. Sun, Y. Increased severity of cerebral ischemic injury in vascular endothelial growth factor-B-deficient mice / Y. Sun, K. Jin, J. T. Childs et al. // *J. Cereb. Blood Flow Metab*. – 2004. – Vol.24. – N.10. – P.1146-1152.

109. Szabo, E. Autocrine VEGFR1 and VEGFR2 signaling promotes survival in human glioblastoma models in vitro and in vivo / E. Szabo, H. Schneider, K. Seystahl et al. // *Neuro Oncol.* – 2016. – Vol.18. – N.9. – P.1242-1252.

110. Taiakina, D. Intratumoral hypoxia as the genesis of genetic instability and clinical prognosis in prostate cancer / D. Taiakina, A. Dal Pra, R. G. Bristow // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2014. – Vol.772. – P.189-204.

111. Takahashi, T. 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 / T. Takahashi, S. Yamaguchi, K. Chida et al. // *EMBO J.* – 2001. – Vol.20. – N.11. – P.2768-2778.

112. Tasaki, Y. Expression of VEGF and its receptors in the bovine endometrium throughout the estrous cycle: effects of VEGF on prostaglandin production in endometrial cells / Y. Tasaki, R. Nishimura, M. Shibaya et al. // *J. Reprod. Dev.* – 2010. – Vol.56. – N.2. – P.223-229.

113. Taylor, A. P. Placental growth factor (PlGF) enhances breast cancer cell motility by mobilising ERK1/2 phosphorylation and cytoskeletal rearrangement / A. P. Taylor, E. Leon, D. M. Goldenberg // *Br. J. Cancer.* – 2010. – Vol.103. – N.1. – P.82-89.

114. Terman, B. I. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor / B. I. Terman, M. Dougher-Vermazen, M. E. Carrion et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1992. – Vol.187. – N.3. – P.1579-1586.

115. Terman, B. I. VEGF receptor subtypes KDR and FLT1 show different sensitivities to heparin and placenta growth factor / B. Terman, L. Khandke, M. Dougher-Vermazan et al. // *Growth Factors.* – 1994. – Vol.11. – N.3. – P.187-195.

116. Thomas, C. P. Alternate processing of Flt1 transcripts is directed by conserved cis-elements within an intronic region of FLT1 that reciprocally regulates splicing and polyadenylation / C. P. Thomas, N. S. Raikwar, E. A. Kelley et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – Vol.38. – N.15. – P.5130-5140.

117. Thor, A. D. Subcellular localization of the HER4 intracellular domain, 4ICD, identifies distinct prognostic outcomes for breast cancer patients / A. D. Thor, S. M. Edgerton, F. E. Jones // *Am. J. Pathol.* – 2009. – Vol.175. – N.5. – P.1802-1809.

118. Tischer, E. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing / E. Tischer, R. Mitchell, T. Hartman et al. // *J. Biol. Chem.* – 1991. – Vol.266. – N.18. – P.11947-11954.

119. Van Limbergen, E. J. FLT1 kinase is a mediator of radioresistance and survival in head and neck squamous cell carcinoma / E. J. Van Limbergen, P. Zabrocki, M. Porcu et al. // *Acta Oncol.* – 2004. – Vol.53. – N.5. – P.637-645.

120. Vaughn, C. Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome in cancer / C. Vaughn, L. Zhang, D. Schiff // *Curr. Oncol. Rep.* – 2008. – Vol.10. – N.1. – P.86-91.

121. Veikkola, T. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice / T. Veikkola, L. Jussila, T. Makinen et al. // *EMBO J.* – 2001. – Vol.20. – N.6. – P.1223-1231.

122. Villegas, G. Autocrine and paracrine functions of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal tubular epithelial cells / G. Villegas, B. Lange-Sperandio, A. Tufro // *Kidney Int.* – 2005. – Vol.67. – N.2. – P.449-457.

123. Vincent, L. Fetal stromal-dependent paracrine and intracrine vascular endothelial growth factor- α /vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling promotes proliferation and motility of human primary myeloma cells / L. Vincent, D. K. Jin, M. A. Karajannis et al. // *Cancer Res.* – 2005. – Vol.65. – N.8. – P.3185-3192.

124. Wang, J. Recombinant human vascular endothelial growth factor receptor 1 effectively inhibits angiogenesis in vivo / J. Wang, M. Shi, Y. Xi et al. // *Mol. Med. Rep.* – 2015. – Vol.11. – N.5. – P.3432-3438.

125. Wang, Y. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt1 in acute myeloid leukemia / Y. Wang, Z. J. Xiao, P. Liu et al. // *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* – 2003. – Vol.24. – N.5. – P.249-252.

126. Wang, Y. N. Membrane-bound trafficking regulates nuclear transport of integral epidermal growth factor receptor (EGFR) and ErbB-2 / Y. N. Wang, H. H. Lee, H. J. Lee et al. // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol.287. – N.20. – P.16869-16879.

127. Wey, J. S. Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines / J. S. Wey, F. Fan, M. J. Gray et al. // *Cancer.* – 2005. – Vol.104. – N.2. – P.427-438.

128. Xiao, Y. Expression of PIGF and Its receptor Flt-1 in Patients with Multiple Myeloma and their Correlation with Chemotherapeutic Efficacy / Y. Xiao, L. L. Miao // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* – 2016. – Vol.24. – N.4. – P.1091-1095.

129. Xu, C. VEGF promotes proliferation of human glioblastoma multiforme stem-like cells through VEGF receptor 2 / C. Xu, X. Wu, J. Zhu // *ScientificWorldJournal.* – 2013. – Vol.2013. – P.417413.

130. Xu, Y. Neuropilin-2 mediates VEGF-C-induced lymphatic sprouting together with VEGFR3 / Y. Xu, L. Yuan, J. Mak et al. // *J. Cell Biol.* – 2010. – Vol.188. – N.1. – P.115-130.

131. Yang, X. VEGF-B promotes cancer metastasis through a VEGF-A-independent mechanism and serves as a marker of poor prognosis for cancer patients / X. Yang, Y. Zhang, K. Hosaka et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2015. – Vol.112. – N.22. – P.2900-2909.

132. Yegorov, Y. E. Enhanced Control of Proliferation in Telomerized Cells / Y. E. Yegorov, M. V. Moldaver, K. S. Vishnyakova et al. // *Ontogenez.* – 2007. – Vol.38. – N.2. – P.105-119.

133. Yin, Y. Blocking effects of siRNA on VEGF expression in human colorectal cancer cells / Y. Yin, L. Y. Cao, W. Q. Wu et al. // *World J. Gastroenterol.* – 2010. – Vol.16. – N.9. – P.1086-1092.

134. Zeng, X. H. Absence of multiple atypical chemokine binders (ACBs) and the presence of VEGF and MMP-9 predict axillary lymph node metastasis in early breast carcinomas / X. H. Zeng, Z. L. Ou, K. D. Yu et al. // *Med. Oncol.* – 2014. – Vol.31. – N.9. – P.145.