

УДК 577.29:57.052:616-006.699

©Коллектив авторов

## РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ АНГИОГЕНЕЗА И ЛИМФАНГИОГЕНЕЗА ПРИ РАЗВИТИИ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

*О.В. Курмышкина, Л.Л. Белова, П.И. Ковчур, Т.О. Волкова\**

Институт высоких биомедицинских технологий,  
Петрозаводский государственный университет,  
185910, Петрозаводск, пр. Ленина, д. 33; тел.: (8142)78-46-97; факс: (8142)71-10-00;  
эл. почта: VolkovaTO@yandex.ru

Способность стимулировать ангиогенез/лимфангиогенез признана неотъемлемым свойством раковых клеток, обеспечивающим их необходимыми условиями для роста и метастазирования. “Ангиогенное переключение” – одно из наиболее ранних следствий злокачественной трансформации, охватывающее большое число генов и запускающее сложную совокупность сигнальных каскадов в клетках эндотелия. Процессы формирования микрососудистой сети опухоли тесно сопряжены с этапами канцерогенеза (от возникновения доброкачественных изменений до инвазивных форм) и протекают с многочисленными отклонениями от нормы. Анализ уровня экспрессии проангиогенных факторов при последовательных этапах развития рака шейки матки (интраэпителиальные неоплазии, рак *in situ*, микроинвазивный и инвазивный рак) дает возможность реконструировать регуляторные механизмы ангиогенеза/лимфангиогенеза и выделить среди них наиболее важные компоненты. В обзоре обобщены данные литературы по экспрессии ключевых регуляторов ангиогенеза при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и раке шейки матки, обсуждается их возможное участие в механизмах трансформации эпителиальных клеток, инвазии и метастазировании. Рассмотрена взаимосвязь уровня экспрессии проангиогенных молекулярных факторов с различными клинико-патологическими параметрами и возможность их использования в диагностике и таргетной терапии рака шейки матки. Особое внимание уделяется сравнительно малоизученным регуляторам лимфангиогенеза и “не-VEGF зависимым”, альтернативным, путям активации ангиогенеза, составляющим перспективу дальнейших исследований в данной области.

**Ключевые слова:** ангиогенез, лимфангиогенез, рак шейки матки, интраэпителиальные неоплазии, сосудистые факторы роста, транскрипционные факторы

**DOI:** 10.18097/PBMC20156105579

### ВВЕДЕНИЕ

Процессы ангиогенеза и лимфангиогенеза обеспечивают формирование единой системы циркуляции внутренней среды организма на всём протяжении его роста и развития. Сложные сети регуляторных взаимодействий поддерживают баланс между пролиферацией эндотелиальных клеток и их дифференцировкой, а также координируют скорость роста новых кровеносных и лимфатических сосудов с потребностями окружающих клеток. Во взрослом организме в норме данные процессы малоактивны, их выраженная индукция может наблюдаться, например, при регенерации тканей, однако, и в этом случае сохраняется равновесие между проангиогенными и ангиостатическими стимулами [1]. Несмотря на то, что процессы

ангиогенеза и лимфангиогенеза приводят к образованию относительно автономных и морфологически различных систем – кровеносной и лимфатической, генетически они очень близки друг другу, имеют общие регуляторные механизмы и могут рассматриваться как единое целое.

Аберрантная активация ангиогенеза и лимфангиогенеза во взрослом состоянии, как правило, является следствием определенных патологических изменений, например, развития воспалительного процесса или роста злокачественной опухоли. В последнем случае процессы (лимф)ангиогенеза тесно переплетаются с процессами неконтролируемой клеточной пролиферации и становятся неотъемлемой частью общих механизмов патогенеза заболевания [1]. Формирование микрососудистого русла опухоли (кровеносного, лимфатического) является не только

\* - адресат для переписки

необходимым условием её роста, но и основным способом диссеминации опухолевых клеток. Важным обстоятельством является то, что опухолеассоциированный ангиогенез (неоангиогенез) протекает с многочисленными отклонениями от физиологической нормы, в результате чего опухолевые сосуды имеют аномальную морфологию и нарушенное функционирование [1, 2]. По этой причине явление неоангиогенеза неизменно остается в центре внимания исследователей на протяжении длительного времени.

Изучение молекулярных механизмов ангиогенеза/лимфангиогенеза в норме и при развитии онкопатологии привело к разработке множества *in vitro* и *in vivo* систем, основанных на использовании различных клеточных линий и экспериментальных животных, применении технологий генной инженерии и 3D-культивирования [1]. Большое значение имеют модели роста спонтанных и перевиваемых опухолей у мышей, без которых невозможно представить исследование функций отдельных молекулярных компонентов регуляторных путей (лимф)ангиогенеза, механизмов их взаимодействий, влияния различных химических агентов. Однако опыт клинического применения анти-ангиогенных препаратов говорит о том, что сведения, полученные с помощью этих моделей, не могут быть полностью перенесены на процессы естественного канцерогенеза у человека [2]. Созданные экспериментальные системы (*in vitro/in vivo*) не способны в полной мере

учесть особенности развития солидных опухолей человека: многоэтапность, длительный период неинвазивного роста, высокую степень гетерогенности, формирование специфического микроокружения. Поэтому очевидно, что моделирование механизмов естественного (лимф)ангиогенеза и сопряженных с ним процессов метастазирования должно основываться на результатах молекулярно-биологических исследований опухолевого материала, полученного при взятии биопсии или в ходе операции. Предположительно, формирование проангиогенного фенотипа (“ангиогенное переключение”) и индукция роста новых микрососудов являются очень ранним событием в развитии опухоли, в связи с чем особую актуальность приобретает анализ предраковых изменений и раннего инвазивного рака. С этой точки зрения плоскоклеточный рак шейки матки (РШМ) может представлять один из наиболее удобных объектов для исследования пусковых факторов и реконструкции механизмов регуляции ангиогенеза и лимфангиогенеза при естественном развитии опухоли у человека.

В отличие от многих типов рака, для плоскоклеточного РШМ морфологически хорошо описаны и клинически легко выявляются все последовательные этапы развития, начиная с самых ранних – цервикальных интраэпителиальных неоплазий (ЦИН) 1, 2, 3 степени и микрокарциномы. ЦИН1/2 в подавляющем большинстве случаев спонтанно регрессирует,

**Принятые сокращения:** ВПЧ – вирус папилломы человека; ИФА – иммуноферментный анализ; ИГХ – иммуногистохимический анализ; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ЦИН – цервикальные интраэпителиальные неоплазии; Ang – ангиопоэтины; COX-2 – циклооксигеназа 2; E – “ранние” (early) ВПЧ-белки (в том числе вирусные онкогены E6 и E7); EGF – эпидермальный фактор роста; ETS (E-26 transformation specific) – эндотелий-специфичный транскрипционный фактор; FAK (focal adhesion kinase) – киназа фокальных контактов; bFGF – основной фактор роста фибробластов; Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) – адаптерный белок, передающий сигнал от тирозинкиназных рецепторов ростовых факторов на Ras/Raf/ERK-путь; HER (human EGF receptor)/ EGFR – семейство рецепторов эпидермального фактора роста человека; HGF – гепатоцитарный фактор роста; HIF1 $\alpha$  – транскрипционный фактор, индуцируемый гипоксией  $\alpha$ ; HMVEC (human microvascular endothelial cells) – линия эндотелиальных клеток микрососудов человека; IL – интерлейкин; JNK (c-Jun N-terminal kinases) – киназа семейства MAPK; c-KIT (CD117) – тирозинкиназа, рецептор стволового фактора роста; LMVD (lymphatic microvessel density) – плотность лимфатических микрососудов; LYVE-1 (Lymphatic Vessel Endothelial Receptor 1) – лимфоэндотелий-специфичный маркер; MAPK – митоген-активируемые протеинкиназы; c-Met/HGFR – рецептор гепатоцитарного фактора роста; MMP – матриксные металлопротеиназы; MVD (microvascular density) – плотность микрососудов; mTOR (mammalian target of rapamycin) – серин/треониновая киназа, регулирующая биосинтез белка, клеточный рост, пролиферацию, клеточную подвижность; PD-ECGF – тимидин-фосфорилаза, тромбоцитарный фактор роста эндотелиальных клеток; PDGF (platelet-derived growth factor) – тромбоцитарный фактор роста (VEGF-семейство); PDPN/D2-40 – подопланин; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; PI3K/Akt-путь – сигнальный путь, контролирующий клеточный цикл и дифференцировку (посредством активации серин/треониновой протеинкиназы АКТ); PL-C $\gamma$  – фосфолипаза C ( $\gamma$ -изоформа), регулируемая тирозинкиназными рецепторами ростовых факторов и передающая сигнал на Raf-MEK-ERK путь посредством активации протеинкиназы C (PK-C); PlGF – плацентарный фактор роста (семейство VEGF); Ras-Raf-MEK-ERK-путь – митоген-активируемый сигнальный каскад, опосредуемый GTPазой Ras, серин/треониновой протеинкиназой Raf и представителями семейства MAPK, контролирующий протекание клеточного цикла; Rho – малая GTPаза, контролирующая динамику актиновых микрофиламентов; Src – нерепеторная тирозинкиназа, воспринимающая сигналы от рецепторов адгезии, ростовых факторов и передающая их на MAP-киназный каскад (Src/MAPK-путь); TGF $\beta$  – трансформирующий фактор роста  $\beta$ ; Tie – тирозинкиназные рецепторы ангиопоэтинов; TNF $\alpha$  – фактор некроза опухолей  $\alpha$ ; TSP – тромбоспондин; uPA – урокиназа/активатор плазминогена; VEGF (vascular endothelial growth factor) – фактор роста эндотелия сосудов; sVEGFR – сывороточная (растворимая) изоформа VEGF-рецептора; VHL (Von Hippel-Lindau tumor suppressor) – компонент убиквитин-лигазного комплекса, контролирующего протеасом-зависимую деградацию HIF1 $\alpha$ .

лишь незначительная доля переходит в ЦИН3 (рак *in situ*, или интраэпителиальный рак) [3]. Переход ЦИН2/ЦИН3 связывают с комплексом молекулярно-генетических нарушений, приводящих к злокачественной трансформации эпителиальных клеток. Главным фактором, стимулирующим последовательную смену этих этапов, является вирус папилломы человека высокого риска (ВПЧ) и его онкогены (E5, E6 и E7) [3]. Одна из особенностей канцерогенеза РШМ состоит в том, что формирование ангиогенного фенотипа кератиноцитов и рост новых капилляров могут происходить на значительно более ранних этапах, чем это могло бы потребоваться клеткам для обеспечения роста. Результаты профилирования транскриптома ЦИН с помощью кДНК-микроматриц указывают на то, что “ангиогенное переключение” инициируется ещё при ЦИН2, то есть фактически сопровождает процесс неопластической трансформации [4] и, возможно, является одним из условий дальнейшей прогрессии ЦИН в рак [5]. Столь раннее установление проангиогенного профиля экспрессии, по-видимому, связано с функционированием онкогенов ВПЧ, которые вызывают масштабные генетические перестройки и эпигенетические изменения, затрагивающие, в том числе, гены и сигнальные пути, контролирующие рост сосудов [3]. Действие ВПЧ-онкогенов в данном случае аналогично индуцирующему влиянию гипоксии или недостатка ростовых факторов. С этой точки зрения, медиаторы ангиогенеза могут быть использованы в качестве диагностических маркеров в тех случаях, когда необходимо дифференцировать доброкачественные и злокачественные изменения или прогнозировать регрессию/прогрессию неоплазии.

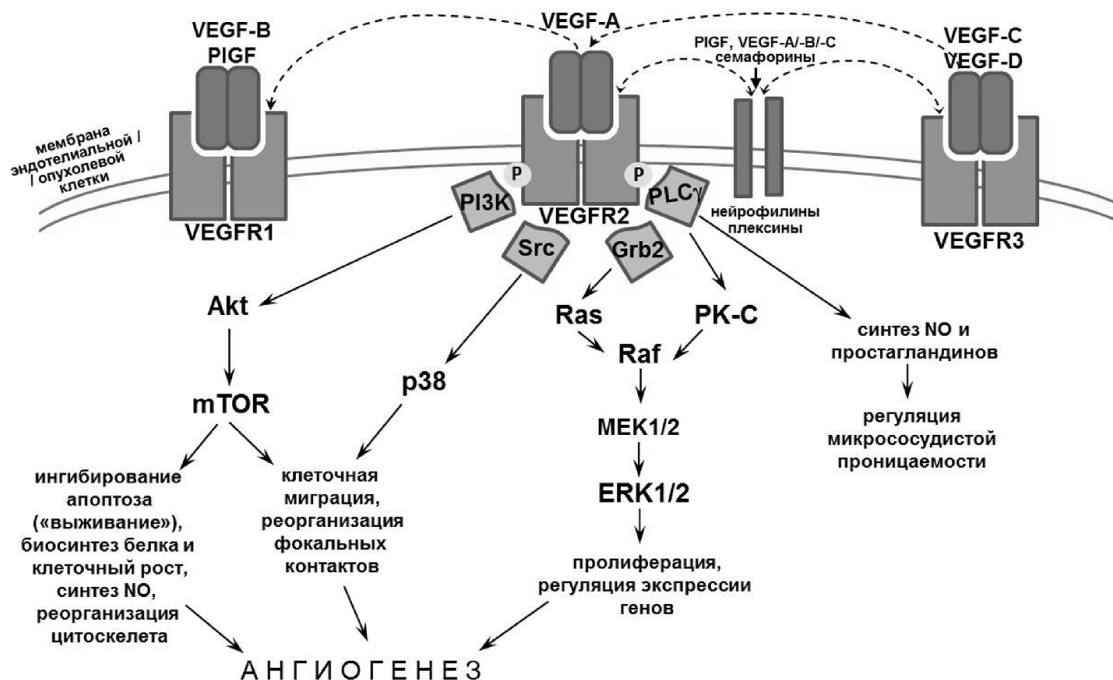
По сравнению с ангиогенезом, проблема лимфангиогенеза является значительно менее изученной, несмотря на то, что для многих типов рака, в том числе РШМ, именно лимфогенное метастазирование является главным способом формирования вторичных очагов опухолевого роста. Обнаружение специфичных лимфоэндотелиальных маркеров позволило установить, что образование лимфатической капиллярной сети *de novo* действительно может происходить на ранних этапах развития РШМ [6]. В остальном же остаётся больше вопросов, чем ответов: насколько опухоль-ассоциированные лимфатические капилляры функциональны, действительно ли они задействованы в регионарном метастазировании, каковы механизмы взаимодействия опухолевых и лимфоэндотелиальных клеток. Знание этих механизмов позволило бы, с одной стороны, разработать панель биомаркеров для надежной диагностики метастазов и составления прогноза, а с другой стороны, выявить возможные мишени для терапии, направленной против основного осложнения рака — метастатической болезни. Применяемые сегодня таргетные препараты не способны эффективно блокировать процессы лимфангиогенеза и/или лимфогенной инвазии, так как их мишенью являются эндотелиальные клетки кровеносных сосудов [7].

Все известные на данном этапе молекулярные компоненты, задействованные в неоангиогенезе, можно разделить на следующие функциональные группы: ангиогенные факторы роста/цитокины и их рецепторы, цитоплазматические компоненты сигнальных каскадов и транскрипционные факторы, ферменты ремоделинга/деградации межклеточного матрикса и медиаторы адгезии, низкомолекулярные биорегуляторы и ферменты их биосинтеза. В данной статье мы сосредоточили внимание на экспрессии ключевых сосудистых факторов роста (VEGF, EGF, FGF, HGF, TGF, PD-ECGF), их рецепторов и проангиогенных транскрипционных факторов (HIF, ETS) при последовательных этапах развития РШМ, потому что именно они запускают множественные молекулярные изменения и являются реперными точками в регуляторных сетях, контролирующих процессы (лимф)ангиогенеза.

## 1. ФАКТОРЫ РОСТА: СОСУДИСТЫЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЙ ФАКТОР РОСТА (VEGF)

Семейство VEGF объединяет 5 членов: VEGF-A, -B, -C, -D и PlGF (плацентарный фактор роста). VEGF-A (VEGF) является наиболее изученным фактором, стимулирующим пролиферацию эндотелиальных клеток и формирование кровеносных сосудов *in vitro* и *in vivo*. VEGF-C и VEGF-D рассматриваются как ключевые регуляторы лимфангиогенеза. Роль VEGF-B и PlGF наименее ясна. Свои эффекторные функции семейство VEGF осуществляет через взаимодействие с тирозинкиназными рецепторами: VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (KDR/Flk-1) и VEGFR3 (Flt-4) (рис. 1). VEGF-A обладает сродством как к VEGFR1, так и к VEGFR2, в то время как VEGF-B и PlGF могут связываться только с VEGFR1. Несмотря на то, что сродство VEGFR1 к своим лигандам на порядок выше, чем VEGFR2, киназная активность VEGFR2 превышает активность VEGFR1, и именно VEGFR2 считается основным рецептором, регулирующим функционирование сосудистого эндотелия [8]. VEGFR3 экспрессируется преимущественно на поверхности лимфоэндотелиальных клеток и активируется факторами VEGF-C и -D. Кроме VEGFR3, VEGF-C и -D могут взаимодействовать с VEGFR2, таким образом одновременно стимулируя процессы ангио- и лимфангиогенеза [6]. Лиганд-индуцированная димеризация и аутофосфорилирование VEGFR приводят к запуску PI3K/Akt-, Src/MAPK-, Ras/Raf-, PL-Cγ- сигнальных путей, необходимых для активации клеточного цикла эндотелиоцитов, реорганизации их цитоскелета, регуляции подвижности и других изменений (рис. 1).

Механизм активации экспрессии VEGF при развитии РШМ имеет ряд особенностей, обусловленных, как было сказано выше, свойствами ВПЧ-онкогенов. ВПЧ16-E6 и -E7 стимулируют секрецию VEGF посредством активации ERK1/2 и PI3K/Akt сигнальных путей [9]. ВПЧ16-E5 способствует гиперэкспрессии VEGF, воздействуя на EGFR-сигналинг [10]. Кроме этого, ВПЧ16-E6



**Рисунок 1.** Схема тирозинкиназного рецепторного каскада, активируемого ростовыми факторами семейства VEGF [6, 8]. Пунктирными стрелками указаны возможные перекрёстные взаимодействия между различными VEGF-факторами и их рецепторами. P - фосфатная группа.

может непосредственно связываться с SP-1 сайтами в промоторной области гена VEGF, выполняя функцию *транс*-активатора [11]. Трансдукция ВПЧ16 в первичные кератиноциты человека приводит к тому, что на самых ранних пассажах в среде наблюдается повышенное содержание проангиогенных факторов, в том числе VEGF, и наоборот, подавляется секреция ингибиторов ангиогенеза, например тромбоспондина-1, то есть экспрессия ВПЧ-генома является главной причиной раннего «ангиогенного переключения» [12]. *In vivo* продукция ВПЧ-онкопротеинов инфицированными клетками фиксируется при дисплазиях легкой степени (ЦИН1) и резко увеличивается при переходе ЦИН2/ЦИН3, что связывают с интеграцией ВПЧ-генома в клеточный геном и снятием негативного контроля над экспрессией E6 и E7. Также исследователями отмечается некоторое повышение экспрессии VEGF при ЦИН1 и существенное повышение – при переходе ЦИН2/ЦИН3/рак *in situ*/микрокарцинома (см. таблицу), что подтверждает причинно-следственную связь между онкогенами ВПЧ и количеством VEGF, установленную *in vitro*.

Большое количество работ посвящено анализу изменений экспрессии VEGF при различных стадиях плоскоклеточного РШМ, его ассоциации с плотностью микрососудов (*microvascular density*, MVD) и клинико-патологическими параметрами, в том числе статусом лимфоузлов, размером опухоли, степенью дифференцированности, глубиной инвазии, ответом на радио-/химиотерапию, вероятностью рецидива, продолжительностью жизни (таблица). Как следует из таблицы, результаты, представленные в этих

работах, достаточно противоречивы. Значительная часть исследований устанавливает положительную корреляцию уровня экспрессии VEGF со стадией, MVD, наличием метастазов в регионарных лимфоузлах, отсутствием ответа на радиотерапию, плохим прогнозом. Основываясь на этих результатах, можно заключить, что: а) VEGF является центральным компонентом механизмов, обеспечивающих неоваскуляризацию РШМ, б) участвует в процессе метастазирования и поддерживает резистентность опухолевых клеток к действию цитотоксических агентов. Однако некоторыми исследователями эти зависимости не подтверждаются (таблица) [13]. Причины разногласий, по-видимому, следует искать в особенностях применяемых методик анализа, критериях отбора больных и в высокой степени микрогетерогенности РШМ.

Особого внимания заслуживает лимфангиогенный фактор VEGF-C. Индукция VEGF-C, наблюдаемая в клетках дисплазии средней/тяжелой степени, может служить маркером начала злокачественного процесса и являться специфическим индикатором ЦИН3, указывая на повышенный риск прогрессии ЦИН в РШМ [5, 14] (таблица). При ранних стадиях РШМ большинством исследователей отмечается значительное увеличение уровня VEGF-C, положительная корреляция между VEGF-C и экспрессией лимфоэндотелиальных маркеров и плотностью лимфатических капилляров (преимущественно перитуморальных), достоверная ассоциация с глубиной инвазии и наличием метастазов в лимфоузлах [15, 35-38]. При РШМ IA-IIA стадий повышенное содержание VEGF-C



Таблица. Экспрессия факторов VEGF-семейства при развитии РШМ.

Степень ЦИН / Стадия РШМ	Молекулярные маркеры	Метод анализа	Результаты / Выводы		Источник
			Изменения экспрессии	Корреляции с клинико-патологическими параметрами	
VEGF в ткани ЦИН/РШМ					
ЦИН1-3, РШМ*	VEGF-A CD105	иммуно-гистохимия (ИГХ)	содержание VEGF-A максимально при ЦИН 3 и положительно коррелирует с CD105 (эндоглином)	экспрессия VEGF-A выше при слабо дифференцированном раке	[13]
РШМ 0-IV	VEGF HIF-1α	ИГХ	экспрессия VEGF и HIF-1α резко увеличивается при РШМ IV стадии и коррелирует с MVD	«-» корреляция VEGF и HIF-1α со статусом лимфоузлов (л/у)	[24]
ЦИН 1-3	VEGF-A	иммуно-флуоресценция	экспрессия VEGF-A увеличивается при ЦИН относительно нормы (наиболее заметно при ЦИН 2 и 3)	не анализировалась (н/а)	[25]
ЦИН 1-3, РШМ*	VEGF TGF-β1	ПЦР	гиперэкспрессия VEGF и TGF-β1 ассоциирована с переходом к ЦИН тяжелой степени	н/а	[26]
ЦИН, РШМ	VEGF мРНК	ПЦР	уровень экспрессии значительно выше при ЦИН 2/3, чем при ЦИН 1, при РШМ – выше, чем при ЦИН	н/а	[27]
ЦИН 1, ЦИН 3 РШМ	VEGF CD34	ИГХ	1. увеличение экспрессии по мере прогрессии; 2. «+»-корреляция с MVD	н/а	[28]
ЦИН 1	VEGF <sub>121,145,165,183,189,206</sub> VEGFR1,2	ПЦР	усиление экспрессии изоформ VEGF коррелирует с увеличением экспрессии их рецепторов	н/а	[29]
РШМ IA <sub>2</sub> , IB <sub>1,2</sub> , IIA, IIB, III	VEGF <sub>121,165,189</sub> VEGF-C, eIF-4E, bFGF TSP-2 MMP-2,9	ПЦР	1. экспрессия изоформ VEGF-A увеличивается более чем на порядок при РШМ; 2. усиление экспрессии VEGF-C и MMP-9 в 130 и 80 раз при РШМ	1. высокая степень корреляции VEGF-C мРНК с метастазами в л/у; 2. наиболее сильное увеличение VEGF-A в опухолях с лимфоваскулярной инвазией	[30]
РШМ IV	VEGF	ИГХ	н/а	1. «+»-ассоциация с метастазами в л/у; 2. «+»-корреляция с глубиной стромальной инвазии и размером опухоли; 3. высокий уровень VEGF – прогностический фактор выживаемости	[31]
РШМ IB-IIA	VEGF (цитозоль)	ИГХ	н/а	1. «+»-корреляция с вероятностью рецидива; 2. VEGF – независимый прогностический фактор безрецидивной выживаемости; 3. уровень VEGF и наличие лимфоваскулярных эмболов – независимые прогностические факторы общей выживаемости	[32]

# АНГИОГЕНЕЗ И ЛИМФАНГИОГЕНЕЗ ПРИ РАЗВИТИИ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ

Таблица. Продолжение.

Степень ЦИН / Стадия РШМ	Молекулярные маркеры	Метод анализа	Результаты / Выводы		Источник
			Изменения экспрессии	Корреляции с клинико-патологическими параметрами	
РШМ IA-IVB	VEGF мРНК	ПЦР	достоверная корреляция с MVD	1. обратная корреляция экспрессии со стадией; 2. отсутствует корреляция со статусом л/у, глубиной стромальной инвазии, размером опухоли	[33]
РШМ IB-IIIB	VEGF PD-ECGF	ИГХ	1. «+»-корреляция VEGF с MVD; 2. обратная корреляция между уровнями экспрессии VEGF и PD-ECGF	н/а	[34]
<i>VEGF-C в ткани ЦИН/РШМ</i>					
РШМ IA <sub>2</sub> , IB <sub>1,2</sub> , IIA, IIB	VEGF-C CD44v3	ИГХ	1. большинство опухолевых клеток позитивны по VEGF-C; 2. VEGF-C позитивные клетки распределены диффузно; 3. «+»-корреляция между экспрессией VEGF-C и CD44v3	1. «+»-корреляция VEGF-C с метастазами в л/у (включая IB <sub>2</sub> ) и TNM-стадией; 2. отсутствие корреляции с опухолевыми эмболами в лимфатических сосудах, степени дифференцированности и FIGO-стадией	[35]
РШМ*	VEGF-C COX-2	ИГХ	«+»-корреляция между экспрессией VEGF-C, COX-2 и LMVD	«+»-корреляция VEGF-C с метастазами в л/у	[36]
РШМ IA, IB, IIA	VEGF-C VEGFR3 D2-40	ИГХ	1. нет корреляции между экспрессией VEGF-C и LMVD; 2. «+»-корреляция между экспрессией VEGFR-3 и LMVD	D2-40 и VEGFR3 независимо ассоциированы с наличием лимфатической инвазии при ранних стадиях РШМ	[18]
ЦИН 1-3 РШМ	VEGF-C, EGF-A, VEGFR2	ПЦР Вестерн-блот ИГХ	1. VEGF, VEGF-C и VEGFR2 не выявляются в нормальном эпителии; 2. экспрессия всех маркеров увеличивается при ЦИН и РШМ	«+»-корреляция уровня экспрессии VEGF-C, VEGF-A и VEGFR2 со стадией	[37]
ЦИН 1-3 РШМ	VEGF-C	ИГХ	1. VEGF-C не выявляется в норме; 2. «+»-корреляция уровня экспрессии со степенью ЦИН и ВПЧ-ВР	экспрессия VEGF-C не ассоциирована с клиренсом ВПЧ-ВР после конизации	[5]
РШМ IA, IB, IIA	D2-40 VEGF-C	ИГХ	высокое содержание VEGF-C на периферических участках опухоли, в лимфатических эмболах и в области перитуморальных лимфатических микрососудов	1. «+»-корреляция с размером опухоли, лимфатической инвазией, статусом л/у, плохим прогнозом; 2. нет корреляции с глубиной инвазии, дифференцированностью и FIGO-стадией	[15]
ЦИН 1-3 РШМ	VEGF-C,-D VEGFR3, LYVE-1/CD34 подоплаин, VEGFR3	ИГХ Гибридизация <i>in situ</i>	1. достоверные различия экспрессии VEGF-C, VEGF-D, VEGFR3 между ЦИН1/2 и ЦИН3, но не между ЦИН3 и РШМ; 2. VEGFR3 (мРНК и белок) обнаруживается в эпителиальных клетках ЦИН3 и РШМ	н/а	[14]

Таблица. Продолжение.

Степень ЦИН / Стадия РШМ	Молекулярные маркеры	Метод анализа	Результаты / Выводы		Источ- ник
			Изменения экспрессии	Корреляции с клинико-патологическими параметрами	
РШМ IB-IV	VEGF-C мРНК	ПЦР	экспрессия при РШМ значительно выше, чем в нормальном эпителии	1. высокая степень корреляции с метастазами в л/у, глубиной стромальной инвазии, инвазией в лимфатические сосуды; 2. ассоциация с неблагоприятным прогнозом; 3. нет достоверных различий в уровне экспрессии транскриптов между стадиями	[38]
<i>sVEGF в сыворотке крови</i>					
РШМ I-IV	sVEGF-C	ИФА		концентрация sVEGF-C не коррелирует с LMVD и выживаемостью	[6]
ЦИН 1-3 РШМ I-IV	sVEGF-A sVEGF-D sVEGF-C sVEGFR1/2	ИФА	достоверное увеличение sVEGF-A и уменьшение sVEGF-D при РШМ по сравнению с ЦИН	1. «+»-корреляция уровня sVEGF-A с ВПЧ-инфекцией при ЦИН; 2. «+»-корреляция sVEGFR2 со статусом л/у; 3. «-»-корреляция sVEGF-D с лимфатической инвазией; 4. отсутствие корреляции уровня sVEGF-C и sVEGFR-1 с инвазией и прогрессией РШМ; 5. ни один из биомаркеров не ассоциирован с FIGO-стадией	[39]
РШМ I-IV	sVEGF-A	ИФА	1. уровень sVEGF-A значительно выше при РШМ, в сравнении с нормой; 2. после терапии содержание sVEGF-A значительно снижается	1. различия в содержании sVEGF-A между стадиями недостоверны; 2. «+»-корреляция с размером опухоли; 3. отсутствие связи с метастазами в л/у	[22]
РШМ I-IV	sVEGF-A sVEGF-C	ИФА	1. концентрация sVEGF-A и sVEGF-C выше при РШМ, по сравнению с контролем; 2. после терапии уровень sVEGF-A и sVEGF-C достоверно снижается	1. корреляция sVEGF-A и sVEGF-C с поздними FIGO-стадиями и большим размером опухоли; 2. отсутствие корреляции с метастазами в л/у; связь sVEGF-C с вероятностью рецидива	[23]
РШМ IB-IVA	sVEGF	ИФА	н/а	1. повышенный уровень sVEGF ассоциирован со слабым ответом на радиотерапию; 2. концентрация sVEGF связана с более коротким периодом безрецидивной выживаемости	[40]
ЦИН 1-3, РШМ	sVEGF-A	ИФА	содержание sVEGF значительно увеличивается при РШМ, в сравнении с нормой	1. «+»-корреляция со стадией, но не с наличием метастаз в л/у; 2. высокий исходный уровень sVEGF не связан с безрецидивной и общей выживаемостью	[41]

Примечание: В таблице и в основном тексте номенклатура стадий РШМ и предраковых изменений приводится в соответствии с цитируемыми источниками. \* - стадия не уточняется.

выявляется в клетках на инвазивном фронте опухоли, а также опухолевых эмболах в просвете лимфатических капилляров [15]. В совокупности эти данные подкрепляют представление о ключевой роли VEGF-C в формировании лимфатической микрососудистой сети, посредством которой осуществляется метастазирование при РШМ. Важно также отметить, что VEGF-C может выступать в качестве аутокринного фактора [16, 17], стимулируя в клетках РШМ те же процессы, что и в клетках эндотелия: реорганизацию цитоскелета, усиление экспрессии медиаторов адгезии, и вследствие этого, повышение подвижности опухолевых клеток и способности к инвазии. Действительно, с помощью иммуногистохимического метода и гибридизации *in situ* было показано, что по мере прогрессии РШМ в опухолевых клетках усиливается экспрессия VEGFR3, основным лигандом которого является VEGF-C [14, 17, 18]. Дополнительным источником факторов VEGF-C/-D в очаге неоплазии могут выступать определенные субпопуляции клеток иммунного происхождения, в первую очередь, макрофаги и тучные клетки. При ЦИН2/3 и карциноме *in situ* обнаруживается существенное увеличение численности инфильтрирующих макрофагов и тучных клеток, коррелирующее с повышением плотности лимфатических и кровеносных микрососудов [19].

Функцию модуляторов лимфангиогенной активности VEGF-C/-D могут выполнять альтернативные компоненты рецепторного комплекса VEGFR2/3 – нейтрофилины, плексины и семафорины (рис. 1). Недавно Liu и соавт. показано увеличение экспрессии семафорина 4D (Sema4D) при прогрессии РШМ, его колокализация с VEGF-C/-D, ассоциация с плотностью лимфатической микрососудистой сети (LMVD) и инвазией в лимфатические сосуды. В данном исследовании выявлено также участие Sema4D и плексина B1 в потенцировании VEGF-C/-D зависимой инвазивности опухолевых клеток линий РШМ [20]. Усиление экспрессии плексина D1 в эндотелии микрососудов РШМ обнаружено Shalaby и соавт. [21]. Несмотря на недостаток более детальных сведений о механизме функционирования и роли VEGF-C/VEGFR3-маркеров при прогрессии ЦИН/РШМ *in vivo*, большинство исследователей указывают на перспективность анализа уровня их экспрессии в диагностике данного заболевания (таблица).

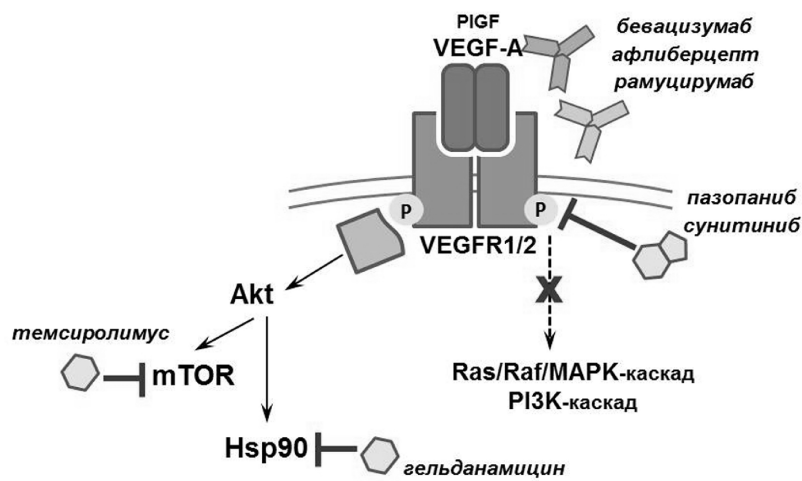
Наиболее противоречивыми являются результаты анализа уровня VEGF-A в сыворотке крови больных РШМ (таблица). Большинство авторов отмечается достоверное увеличение концентрации VEGF-A (sVEGF) при РШМ IB-IV стадий, в сравнении с группой контроля или ЦИН. Некоторые исследователи также сообщают о тенденции к повышению уровня sVEGF по мере увеличения стадии РШМ, однако, большинство работ указывают на отсутствие такой зависимости. Также не подтверждается корреляция между концентрацией sVEGF и статусом лимфоузлов. В литературе нет данных о содержании sVEGF

при микрокарциноме шейки матки (стадия IA1), и поэтому не известно, насколько рано в развитии РШМ может фиксироваться изменение уровня sVEGF в кровообращении. После хирургического удаления опухоли и курса химиорadiотерапии содержание в крови sVEGF достоверно снижается [22, 23], однако, может ли его первоначальный уровень указывать на вероятность рецидива, прогнозировать ответ на терапию и выживаемость больных – по-прежнему дискуссионный вопрос. Несмотря на то, что роль sVEGF или растворимых изоформ его рецепторов в прогрессии РШМ не выяснена, есть основания предполагать возможность использования sVEGF в качестве суррогатного маркера для оценки эффективности различных вариантов лечения и мониторинга больных.

Установленная взаимосвязь уровня тканевой экспрессии VEGF-C с лимфангиогенезом и метастазированием при РШМ наводит на мысль о том, что концентрация VEGF-C в крови может иметь прогностическую ценность. Однако на этот счёт у исследователей нет единого мнения. В основном сообщается, что значимое увеличение содержания sVEGF-C наблюдается на более поздних стадиях. Его корреляция с наличием метастаз в лимфоузлах одними авторами подтверждается, другими опровергается (таблица).

Высокая способность РШМ к формированию резистентности к стандартной химиорadiотерапии вынуждает искать альтернативные варианты лечения, основанные на применении таргетных препаратов. На сегодняшний день известны две группы препаратов, направленных на ингибирование VEGF-опосредованного ангиогенеза: 1) препараты, препятствующие взаимодействию VEGF-A с VEGFR1/2 на клеточной поверхности (к данной группе относятся: бевацизумаб – моноклональное анти-VEGF-A антитело, афлиберцепт – химерный белок-“ловушка”, состоящий из лиганд-связывающих доменов VEGFR1/2 и Fc-фрагментов IgG1 человека, связывающий VEGF-A и PlGF, рамуцирумаб – антитело, блокирующее VEGFR2); 2) препараты, ингибирующие активацию внутриклеточных тирозинкиназных доменов рецепторов и дальнейшую передачу сигнала (например, низкомолекулярные мультитаргетные ингибиторы VEGFR, PDGFR, FGFR и c-KIT – пазопаниб, суинитиниб, нинтеданиб) (рис. 2). В 2014 году Tewari и соавт. опубликованы результаты III фазы клинических испытаний бевацизумаба в комплексе со стандартной химиотерапией при лечении метастатического и рецидивирующего РШМ (“GOG 240, Gynecologic Oncology Group”), в рамках которого показано достоверное увеличение периода ремиссии и продолжительности жизни больных [42, 43]. В клиническом испытании “Radiation Therapy Oncology Group clinical trial 0417” также продемонстрировано увеличение показателей эффективности лечения при сочетании химиорadiотерапии с бевацизумабом при лечении женщин с IB-IIIВ стадией РШМ [44]. Эффективность других препаратов данной категории при терапии





**Рисунок 2.** Молекулярные мишени антиангиогенной (анти-VEGF) терапии РШМ (адаптировано из [50]).

РШМ пока не исследовалась. Согласно Monk и соавт., применение пазопаниба повышает продолжительность жизни пациенток с IV стадией РШМ [45], однако, использование другого ингибитора – сунитиниба – не влияет на результат лечения [46].

На уровне доклинических исследований ведётся поиск альтернативных молекулярных мишеней для блокирования ангиогенеза при лечении РШМ. Как было сказано выше, активация VEGFR приводит к запуску PI3K/Akt-сигнального пути. mTOR-киназа является его ключевой мишенью, играющей важную роль в ангиогенезе, пролиферации и выживании клеток (рис. 1). Под действием mTOR-киназы повышается интенсивность биосинтеза VEGF и других медиаторов ангиогенеза посредством фосфорилирования белков-регуляторов инициации трансляции p70S6K и 4EBP1 [47]. Обнаружено также непосредственное участие ВПЧ-онкогена Е6 в активации mTOR-комплекса [48]. Следовательно, mTOR-ингибиторы, одобренные для лечения некоторых типов рака (например, молочной железы, почек, нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы), могли бы использоваться в качестве анти-ангиогенных препаратов в комплексной терапии РШМ (рис. 2). Однако единственный mTOR-ингибитор, подвергнутый клиническим испытаниям для РШМ – темсиролимус – оказался малоэффективным [49, 50]. Другой перспективной мишенью анти-VEGF терапии является белок теплового шока Hsp90, регулирующий передачу сигналов с различных рецепторных тирозинкиназ, в том числе VEGFR и PDGFR. Hsp90-специфический ингибитор гелданамицин проявляет выраженную анти-ангиогенную активность в различных *in vivo/in vitro* модельных системах [51]. Клинические испытания Hsp90-ингибиторов при лечении РШМ не проводились [50].

Безусловно, назначение анти-ангиогенных таргетных препаратов требует разработки критериев, позволяющих спрогнозировать результат их применения у конкретного пациента, в силу того что эти препараты вызывают серьезные побочные

эффекты. Однако достоверные данные о том, что уровень тканевой или сывороточной экспрессии представителей VEGF-семейства может обладать характеристиками предикторных маркеров, пока отсутствуют [52].

## 2. ФАКТОРЫ РОСТА: ЭПИДЕРМАЛЬНЫЙ ФАКТОР РОСТА (EGF) И ЕГО РЕЦЕПТОР (EGFR)

EGF – полифункциональный ростовой фактор, регулирующий процессы клеточной пролиферации, дифференцировки, апоптоза, а также межклеточную адгезию и подвижность. Мишенями EGF могут быть различные типы клеток, имеющие на поверхности мембраны его рецептор. Как и VEGFR, семейство EGFR принадлежит к типу рецепторов с тирозинкиназной активностью и объединяет 4 представителя: EGFR (HER1 или erbB1), erbB2 (HER2), erbB3 (HER3) и erbB4 (HER4) [53]. Лиганд-индуцированная гомо-/гетеродимеризация рецептора активирует ключевые внутриклеточные сигнальные каскады – RAS-RAF-MEK-ERK1/2, PI3K/Akt и PLC-γ/PKC (рис. 3). Очень часто развитие солидных опухолей ассоциировано с aberrантной гиперактивацией EGF-сигнального пути, и РШМ не является исключением. Основная причина нарушения регуляции EGF-пути связана с повышенной мембранной экспрессией EGFR или его аномальной киназной активностью (в результате амплификации гена, увеличения времени жизни или активирующих точечных мутаций во внутриклеточном тирозинкиназном домене).

Поскольку эндотелиальные клетки содержат на своей поверхности EGFR, одним из биологических эффектов EGF является стимуляция ангиогенеза [54]. *In vitro* под действием EGF HMVEC клетки способны пролиферировать, мигрировать и формировать сосудистые трубки. При развитии опухоли *in vivo* EGF может стимулировать неоангиогенез прямо или опосредованно. В первом случае, опухолевые клетки и клетки стромы секретируют повышенные

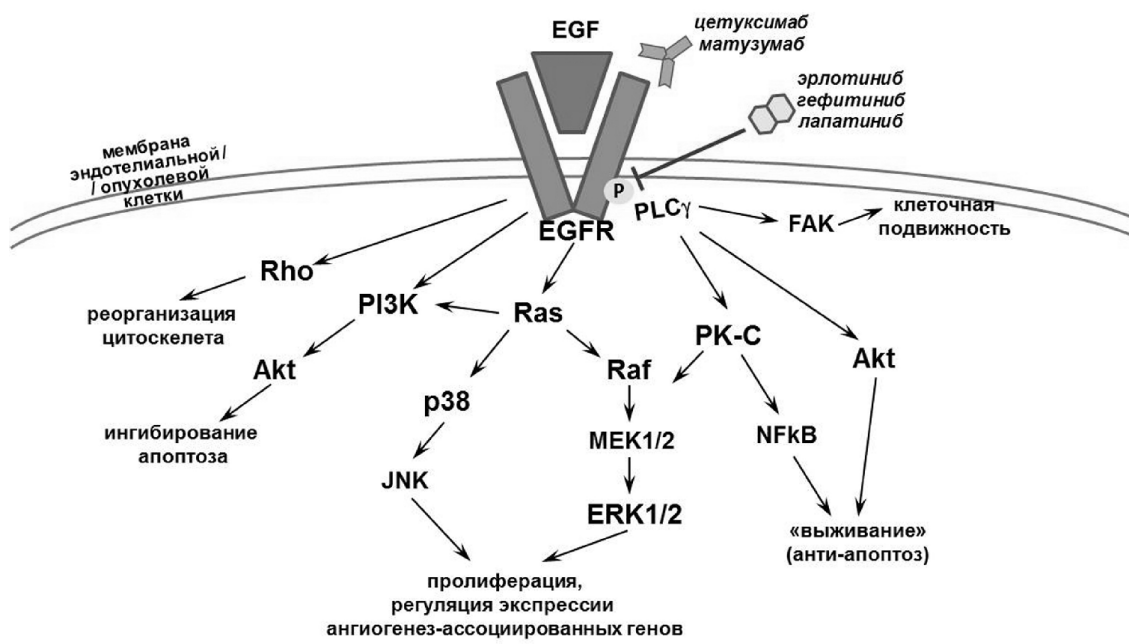


Рисунок 3. Ключевые компоненты EGFR-опосредованного сигнального пути (адаптировано из [53]).

количества EGF, вызывающие прорастание микрососудов в опухоль. В случае же опосредованного механизма, гиперактивация EGFR-зависимого пути в самих опухолевых клетках усиливает экспрессию генов VEGF, IL-8 и других ангиогенных факторов [54].

Несмотря на то, что изменения экспрессии EGFR при развитии ЦИН/РШМ описаны в литературе достаточно подробно, очень мало информации о взаимосвязи EGF/EGFR-зависимого пути с процессами ангио-/лимфангиогенеза. В норме только клетки базального (ростового) слоя сквамозного эпителия шейки матки являются EGF-зависимыми и экспрессируют EGFR. В ВПЧ-инфицированных клетках ЦИН/РШМ под действием онкогенов вируса происходит усиление биосинтеза и аккумуляция EGFR на поверхности мембраны. В то же время, для РШМ не характерны мутации, приводящие к образованию конститутивно активной формы рецептора, в отличие, например, от рака молочной железы или рака легкого [55]. Роль, схожую с активирующими мутациями, может играть белок E6: Spangle и соавт. обнаружено, что ВПЧ16-E6 поддерживает активированное фосфорилированное состояние EGFR на протяжении значительно более длительного времени, чем в нормальных кератиноцитах, и, возможно, даже в отсутствие EGF [56]. Также ВПЧ16-E6 стимулирует интернализацию EGF/EGFR-комплекса и его переход в состав ранних эндосом, что является важным условием для дальнейшей передачи сигнала [56]. Другой онкопротеин вируса – E5 – ингибирует активность эндосомальной H<sup>+</sup>-АТФазы и препятствует закислению эндосом, замедляя таким образом процесс деградации EGFR и способствуя его возвращению на поверхность клетки. Согласно результатам Kim и соавт., трансфекция клеток

ВПЧ16-E5 приводит к увеличению секреции VEGF, однако, этот эффект полностью блокируется при добавлении ингибиторов EGFR [10]. Следовательно, проагиогенное действие E5 при развитии РШМ является EGFR-опосредованным. Исследования Akerman и соавт. и Sizemore и соавт. доказывают непосредственное участие белков E6 и E7 в усилении транскрипции гена EGFR [57, 58]. Увеличение числа копий гена EGFR в результате его амплификации или увеличения ploidy соответствующего хромосомного фрагмента – альтернативный механизм повышения уровня его экспрессии при развитии плоскоклеточного РШМ. Согласно результатам, полученным Li и соавт., увеличение числа копий EGFR-гена может быть причиной примерно трети случаев гиперэкспрессии рецептора при ЦИН2/3 и РШМ [59], следовательно, это не единственный механизм, реализуемый *in vivo*. Схожие результаты получены и другими авторами [60, 61].

Наиболее заметное усиление экспрессии EGFR/erbB1 происходит на этапе ЦИН2/3 [59, 60, 62]. Начиная с ЦИН1, все больше EGFR-позитивных клеток обнаруживаются в супрабазальных слоях измененного эпителия. Как отмечают Balan и соавт., интенсивность экспрессии EGFR в образцах ЦИН2 выше, чем в ЦИН3 [63]. Уровень EGFR в клетках РШМ достоверно не отличается от ЦИН3 [59]. Из этих данных следует, что нарушение регуляции EGFR-зависимого сигнального пути является достаточно ранним событием, фактически сопровождающим процессы неопластической трансформации эпителиальных клеток и формирования ангиогенного профиля. Как было сказано выше, прямых данных, доказывающих влияние гиперэкспрессии EGFR или других представителей erbB-семейства на (лимф)ангиогенез при развитии

РШМ, на данный момент нет. Об участии EGF/EGFR в стимуляции неоангиогенеза, инвазии и метастазирования можно судить по некоторым косвенным данным. В частности, исследователи сообщают о корреляции высокого уровня EGFR с метастазами в лимфоузлах, риском рецидива и низкой продолжительностью жизни больных РШМ, однако, в ряде публикаций эта взаимосвязь опровергается (см. обзор [55]).

Принимая во внимание, что EGFR может играть компенсаторную роль при целенаправленном подавлении VEGF-сигнального пути [54] и обеспечивать невосприимчивость к антиангиогенной терапии или быстрое возобновление прогрессии заболевания после её отмены, использование анти-EGFR агентов в комплексе с цитотоксическими и анти-VEGF препаратами могло бы улучшить показатели эффективности лечения больных РШМ в тех случаях, когда наблюдается амплификация гена *erbB* и/или его гиперэкспрессия. Однако пока клинические испытания анти-EGFR препаратов не подтверждают их эффективность: в качестве монотерапии они, как правило, не дают ожидаемый клинический результат, а при сочетании с химиотерапией проявляют сильный токсический эффект. Тем не менее, продолжаются исследования различных режимов химиорадиотерапии в комбинации с анти-EGFR агентами, среди которых моноклональные анти-EGFR/erbB1 антитела – цетуксимаб и матузумаб, при лечении РШМ [50] (рис. 3). Целесообразность использования анти-HER2 антитела трастузумаба остаётся открытым вопросом: многими исследователями подтверждается, что гиперэкспрессия HER2/Neu – очень редкое явление при развитии РШМ, однако, ассоциированное с очень неблагоприятным прогнозом. Применение EGFR-специфичных ингибиторов тирозинкиназной активности – гефитиниба и лапатиниба – оказалось ожидаемо неэффективным, так как для РШМ не характерны активирующие мутации в тирозинкиназном домене EGF-рецепторов. Определённые улучшения показателей наблюдались при использовании эрлотиниба в сочетании с цисплатином и радиотерапией [50]. Возможно, отсутствие предполагаемого клинического эффекта от применения анти-HER агентов связано с недостаточным пониманием функций отдельных представителей данного семейства рецепторов в процессах развития РШМ; очень мало внимания уделено HER3 и HER4. По сообщению Fuchs и соавт., именно соотношение уровней экспрессии HER 1, 3 и 4 имеет определяющее значение для прогрессии РШМ и является актуальным вопросом дальнейших исследований [64].

### 3. ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ: ФАКТОР, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ГИПОКСИЕЙ-1 (HIF-1)

Транскрипционный фактор HIF-1 служит внутриклеточным сенсором парциального давления кислорода ( $pO_2$ ) и в норме отвечает за адаптацию клеток к условиям гипоксии. Запускаемые HIF-1 адаптивные механизмы включают как метаболическую

перестройку (переход на анаэробный тип обмена), так и активацию ангиогенеза. Идентифицированы десятки подконтрольных HIF-1 генов, значительная часть которых кодирует медиаторы ангиогенеза: ростовые факторы VEGF, SDF1, PlGF, PDGF-B, ангиопоэтины, ферменты деградации межклеточного матрикса MMP2, MMP9, MMP14, факторы клеточной подвижности AMF, MET, молекулы межклеточной адгезии L1CAM и другие [65]. Одна из двух субъединиц HIF-1 (HIF-1) является регуляторной и обуславливает зависимость ДНК-связывающей активности фактора от  $pO_2$ . Ген *hif-1 $\alpha$*  транскрибируется на постоянном и относительно высоком уровне независимо от  $pO_2$ , однако, в условиях нормоксии его белковый продукт подвергается быстрой деградации в протеасомах по VHL-зависимому пути, в результате чего внутриклеточное содержание и активность HIF-1 $\alpha$  поддерживается на низком уровне [66]. При недостатке кислорода скорость деградации HIF-1 $\alpha$  уменьшается, что приводит к его аккумуляции в цитоплазме/ядре клеток и активации генов-мишеней, содержащих в области промотора HRE-сайт (*hypoxia-responsive element*).

Для раковых клеток характерно повышенное содержание HIF-1 $\alpha$ , что традиционно связывают с условиями гипоксии, возникающими в очаге опухоли в результате быстрого накопления клеточной массы [65, 66]. Однако появляется всё больше данных, указывающих на существование альтернативных,  $pO_2$ /VHL-независимых механизмов аккумуляции HIF-1 $\alpha$  [66]. Преимущественно эти механизмы направлены на увеличение скорости биосинтеза HIF-1 $\alpha$  (транскрипции, трансляции), а не на снижение скорости его деградации. В частности, ген *hif-1 $\alpha$*  является мишенью таких транскрипционных факторов, как SP-1, AP-1 и NF- $\kappa$ B, поэтому активация соответствующих сигнальных каскадов под действием онкогенных вирусов (в том числе, ВПЧ) приводит к повышению его экспрессии. Усиление трансляции мРНК HIF-1 $\alpha$  может быть результатом гиперактивированного состояния PI3K/Akt/mTOR-сигнального пути, свойственного многим типам рака, включая РШМ [66]. Становятся также известны ВПЧ-специфичные механизмы увеличения активности или количества HIF-1 $\alpha$  [67, 68]. Например, обнаружена способность белка E7 непосредственно связываться с HIF-1 $\alpha$  и вытеснять его из комплекса с гистондеацетилазами (HDAC1, HDAC4, HDAC7), стимулируя тем самым формирование активного транскрипционного комплекса [67]. E7-опосредованное нарушение функционирования клеточных систем убиквитинирования может являться причиной снижения скорости оборота HIF-1 $\alpha$  и его накопления в ВПЧ-инфицированных клетках. Индуцируемая ВПЧ-онкогенами геномная нестабильность может составлять другую причину гиперэкспрессии HIF-1 $\alpha$ . Например, в образцах РШМ было обнаружено снижение уровня транскриптов ключевого негативного регулятора стабильности HIF-1 $\alpha$  – пролилгидроксилазы PHD2, вызванное



накоплением мутаций в промоторной области гена [68]. Таким образом, HIF-1 $\alpha$  нельзя считать “эндогенным маркером гипоксии” при развитии РШМ, так как даже на начальных этапах канцерогенеза другие факторы, отличные от pO<sub>2</sub>, в большей степени определяют повышенный уровень HIF-1 $\alpha$  [69].

Основываясь на экспериментальных данных о механизмах регуляции экспрессии HIF-1 $\alpha$  в ВПЧ-позитивных клетках, можно предполагать, что *in vivo* увеличение содержания HIF-1 $\alpha$  будет фиксироваться на ранних этапах развития РШМ. И действительно, по данным ряда работ, при ЦИН2/3 наблюдается повышенный уровень HIF-1 $\alpha$ , сопоставимый с таковым при инвазивном РШМ [70, 71]. Эти данные указывают на то, что HIF-1 $\alpha$  может принимать участие в формировании микрососудистой сети на стадии интраэпителиального развития РШМ, и позволяют рассматривать HIF-1 в качестве потенциального диагностического маркера цервикальных неоплазий.

В отношении взаимосвязи уровня экспрессии HIF-1 $\alpha$  с клиническими характеристиками инвазивного РШМ существует много разногласий. Выявленная одними авторами корреляция содержания HIF-1 $\alpha$  со стадией заболевания не подтверждается работами других авторов [24, 69, 72, 73]. Некоторыми авторами также сообщается об отсутствии достоверной взаимосвязи HIF-1 $\alpha$  с размером опухоли и статусом лимфоузлов [69-73], что не позволяет однозначно судить о роли HIF-1 $\alpha$  в метастазировании РШМ. В то же время, многие исследователи отмечают сильную отрицательную корреляцию уровня экспрессии HIF-1 $\alpha$  с общей/безрецидивной выживаемостью больных РШМ, ответом на первичную радиотерапию и вероятностью рецидива, на основании чего предлагается рассматривать HIF-1 $\alpha$  как независимый прогностический фактор [70, 74-76]. По-видимому, связь HIF-1 $\alpha$  с неблагоприятным течением заболевания объясняется плейотропностью данного транскрипционного фактора: кроме медиаторов ангиогенеза, мишенями HIF-1 $\alpha$  являются многие регуляторы апоптоза (BAX, BID, Bcl-2, survivin/BIRC5), компоненты системы репарации ДНК (DNA-PKcs, топоизомераза II), факторы множественной лекарственной устойчивости (MDR1, BCRP), генераторы активных форм кислорода; поэтому HIF-1 может повышать общую резистентность трансформированных клеток к разнообразным цитотоксическим агентам и про-апоптотическим стимулам [65].

Несмотря на противоречивость сведений о закономерностях изменения экспрессии HIF-1 $\alpha$  в зависимости от клинико-патологических параметров РШМ, все они согласуются с общими представлениями о важной роли HIF-1 $\alpha$  в прогрессии опухоли, однако, в литературе пока описаны лишь единичные результаты, подтверждающие значение HIF-1 $\alpha$  в индукции ангиогенеза при естественном развитии РШМ [69, 77]. Только в некоторых работах анализируется взаимосвязь

HIF-1 $\alpha$  и микроваскулярной плотности, колокализация или коэкспрессия HIF-1 $\alpha$  с другими маркерами ангиогенеза. Например, Fujimoto и соавт. сообщают о существовании положительной корреляции между уровнем экспрессии HIF-1 $\alpha$  и эндотелиальными маркерами (CD34, фактор VIII), а также между HIF-1 $\alpha$  и проангиогенными факторами PD-EGF и интерлейкином-8 при РШМ I-III стадий [69]. В исследовании Dellas и соавт. показана коэкспрессия VEGF и HIF-1 $\alpha$ , которая, однако, не подтверждается работами No и соавт. и Fujimoto и соавт. [69, 71, 77]. Авторы делают предположение о том, что *in vivo*, в ходе естественного развития РШМ, HIF-1 $\alpha$  является далеко не единственным индуктором экспрессии VEGF [71]. Это в очередной раз свидетельствует о необходимости критического подхода при переносе схем регуляторных взаимодействий, установленных *in vitro*, на процессы естественного канцерогенеза. Более детальной информации об участии HIF-1 $\alpha$  в ангиогенезе по мере прогрессии РШМ не обнаружено.

Важно также иметь в виду существование второго члена HIF-семейства – HIF-2, который имеет общую с HIF-1 субъединицу HIF-1 $\beta$ , но отличную регуляторную субъединицу HIF-2 $\alpha$ . Функции HIF-1 и -2 лишь частично перекрываются: если HIF-1 считается основным регулятором самых ранних этапов ангиогенеза, то HIF-2, по-видимому, отвечает за перестройку и созревание первичной примитивной микрососудистой сети [78]. Повышенный уровень экспрессии HIF-2 $\alpha$ , ассоциированный с плохим прогнозом, обнаружен при некоторых типах рака (рак почек, нейробластома, глиобластома, немелкоклеточный рак лёгкого). Для РШМ недавно была выявлена взаимосвязь уровня HIF-2 $\alpha$  с неэффективностью радиотерапии и вероятностью рецидива [79]. Дальнейшее изучение динамики экспрессии фактора HIF-2 $\alpha$  в зависимости от разных клинических параметров РШМ представляется весьма актуальным в связи с его участием в регуляции дифференцировки капилляров. Морфология опухолевых микрососудов в значительной степени определяет эффективность доставки лекарственных препаратов и уровень окислительных процессов в клетках опухоли, от которого зависит степень ДНК-повреждающего действия радиоизлучения. Считается, что эффект целенаправленной антиангиогенной (анти-VEGF/EGFR) терапии заключается, скорее, в нормализации морфологии существующих сосудов опухоли, чем в подавлении роста новых. Возможно, анализ уровня экспрессии HIF-2 $\alpha$  позволил бы объективно оценивать данные процессы.

В литературе активно обсуждается проблема целенаправленного ингибирования активности HIF-факторов (в первую очередь, HIF-1) при комплексном лечении онкологических заболеваний [80]. На сегодняшний день ни один из потенциальных анти-HIF-1 препаратов не одобрен для клинического применения. Многими исследователями подвергается сомнению сама возможность подобрать действительно эффективные

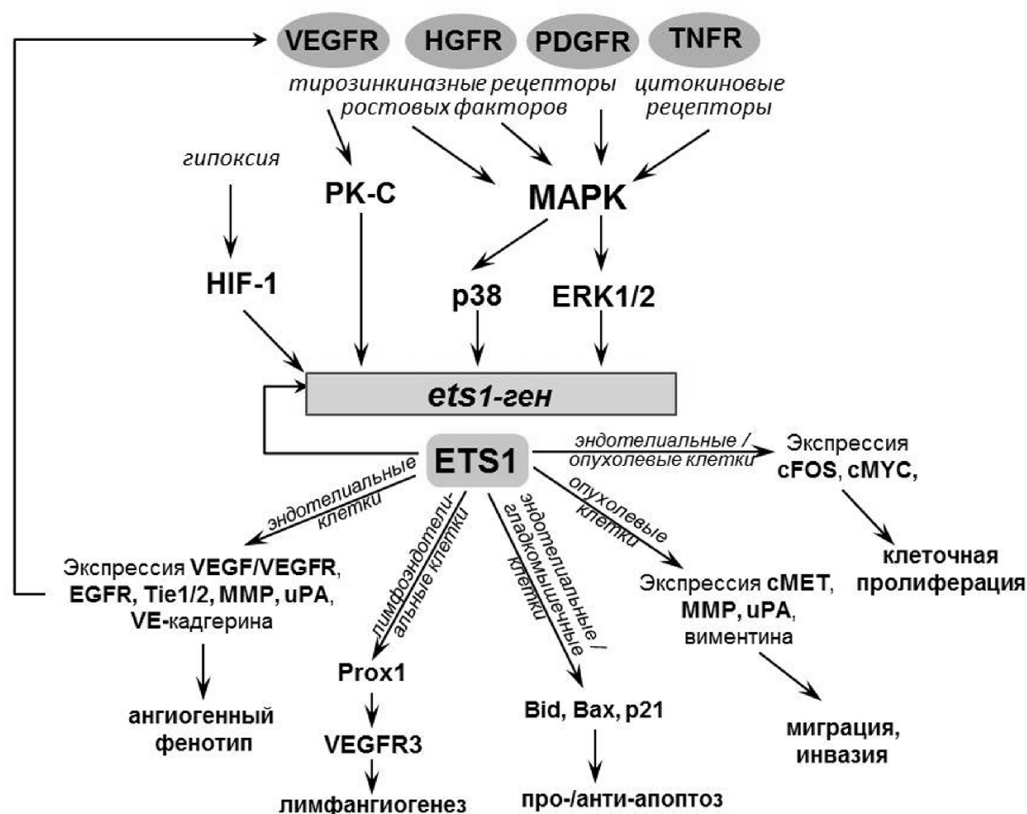


и специфичные ингибиторы HIF-1 [80]. В основном, эти сомнения связаны с представлением о том, что транскрипционные факторы, каковым является HIF-1, принципиально не могут выступать в качестве молекулярных мишеней для искусственно полученных химических агентов. Во-первых, HIF-1 интегрирует многочисленные (в том числе, функционально противоположные) сигнальные каскады, из-за чего практически невозможно предсказать конечный результат ингибирования его активности. Во-вторых, пока считается маловероятной разработка химических соединений, блокирующих многочисленные белок-белковые взаимодействия, составляющие суть трансаактивирующего действия HIF-1 [80]. Некоторые из применяемых сегодня анти-ангиогенных таргетных препаратов косвенно влияют на экспрессию/активность HIF-1, так как действуют на общие регуляторные компоненты сигнальных путей клетки (например, mTOR-ингибиторы). Также известно, что ингибиторы топоизомеразы I (топотекан, камптотецин) приводят к снижению скорости биосинтеза HIF-1 по механизму, не связанному с их способностью индуцировать разрывы ДНК. Предположительно, в результате изменения доступности определенных хроматиновых участков при ингибировании активности топоизомеразы I становится возможным считывание длинной антисмысловой анти-HIF-1 $\alpha$  РНК (5'aHIF1alpha lncRNA), нарушающей трансляцию

$\alpha$ -субъединицы HIF-1-фактора [81]. За последние пять лет было проведено несколько клинических испытаний различных режимов использования топотекана при лечении рецидивирующего РШМ, в том числе в комбинации с цисплатином и бевацизумабом [82]. К сожалению, большинство исследованных режимов сопряжено с высокой токсичностью либо неэффективно. Тем не менее, остаётся надежда на то, что сочетание HIF-ингибиторов со стандартной химиотерапией и/или антиангиогенными препаратами способно повысить эффективность лечения при условии селективного их назначения, основанного на анализе экспрессии биомаркеров [82].

#### 4. ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ: СЕМЕЙСТВО ETS (E-26 TRANSFORMATION SPECIFIC)

Семейство протоонкогенов ETS объединяет 28 транскрипционных факторов, контролирующих различные клеточные программы и экспрессирующихся в разных типах клеток, однако, именно в эндотелиальных клетках ETS-факторы играют роль центральных регуляторов генной активности (рис. 4). Все известные сегодня специфичные для эндотелия энхансеры и промоторы содержат участки связывания ETS-факторов [83]. Многие ETS-зависимые гены необходимы для регуляции ангиогенеза (пролиферации, миграции и дифференцировки



**Рисунок 4.** Сигнальные механизмы активации экспрессии и реализации биологического действия транскрипционных факторов семейства ETS (на примере прототипического представителя - ETS1).

эндотелиоцитов). К ним относятся гены, кодирующие VEGFR2, рецепторы ангиопоэтинов Tie-1 и Tie-2, эндотелиальную NO-синтазу, матриксные металлопротеиназы MMP-1,3,9 и u-PA, интегрин  $\beta 3$ , ICAM-2 и VE-кадгерин. Наиболее хорошо изучена проангиогенная активность фактора ETS-1. Индукция экспрессии ETS-1 в клетках эндотелия и соседних интерстициальных клетках происходит в ответ на действие ростовых факторов (VEGF, FGF) или цитокинов (TNF $\alpha$ , IL-8), секретируемых опухолью. В самих опухолевых клетках также может наблюдаться гиперпродукция ETS-1, определяющая их повышенный ангиогенный и инвазивный потенциал (рис. 4).

По сравнению с другими опухолями репродуктивной системы (раком молочной железы, яичников, простаты), участие ETS-факторов в канцерогенезе РШМ практически не исследовано. В иммортализованных *in vitro* кератиноцитах выявлено повышение уровня экспрессии двух представителей ETS-семейства – ETS-2 и ERG, – обусловленное интеграцией ВПЧ-генома поблизости от *ets*-локуса (21q22.2-22.3) [84]. Нарушенная регуляция экспрессии *ets2* и *erg* генов, вероятно, связана со значительными структурными перестройками (транслокациями, инверсиями), вызванными встраиванием вирусной ДНК. Другой причиной индукции генов *ets* может быть их переход в гипометилированное состояние, которое также провоцируется ВПЧ-интеграцией [85]. Таким образом, активация экспрессии ETS-факторов в ВПЧ-инфицированных эпителиальных клетках ассоциирована с наиболее критичным, переломным моментом в жизненном цикле вируса и, следовательно, с началом процесса малигнизации кератиноцитов. Поскольку в спектр ETS-регулируемых генов входят ангиогенные ростовые факторы (в том числе VEGF, FGF, HGF), металлопротеиназы, необходимые для их “созревания”, и ингибиторы ангиогенеза, то можно предположить, что гиперэкспрессия ETS будет способствовать раннему формированию ангиогенного фенотипа цервикальных неоплазий. Раннее (на этапе ЦИН) увеличение содержания ETS-2 относительно нормального эпителия действительно было обнаружено, однако, взаимосвязь уровня ETS-2 с маркерами ангиогенеза авторы не исследовали [86].

При инвазивном РШМ фактор ETS-1 обнаруживается как в эндотелиальных клетках опухолевых сосудов, так и в самих опухолевых клетках, и его содержание коррелирует с экспрессией VEGFR2 и MMP1, статусом лимфоузлов и 5-летней выживаемостью [87]. Высокая степень корреляции ETS-1 мРНК с плотностью микрососудов при РШМ IB-IIВ стадий также подтверждает взаимосвязь с прогнозом [88]. При этом, ETS-1 экспрессируется преимущественно в клетках эндотелия и соседних интерстициальных клетках, но не опухолевых клетках РШМ.

Как показал анализ литературы, изучение роли транскрипционных факторов ETS-семейства в развитии РШМ не носит системного

характера, имеющиеся данные очень фрагментарны и в значительной степени противоречивы. Тем не менее, очевидна необходимость расширения исследований динамики и причин изменения экспрессии ETS-факторов на разных ступенях прогрессии ЦИН/РШМ. Результаты функционального тестирования генов семейства *ets*, полученные с использованием различных культур клеток и экспериментальных животных, позволяют с уверенностью говорить о том, что ETS-факторы имеют первостепенное значение для всех этапов ангиогенеза – не только в норме, но и при формировании микрососудистой сети опухоли (рис. 4) [83, 89]. Тот факт, что большинство медиаторов ангиогенеза подконтрольны ETS, дает возможность рассматривать исходный уровень экспрессии ETS-факторов как критерий толерантности опухоли к антиангиогенной терапии.

Особенно актуальным изучение экспрессии ETS-факторов при ЦИН/РШМ представляется в связи с недавним обнаружением их ведущей роли в индукции и поддержании лимфангиогенеза [90]. Члены ETS-семейства непосредственно взаимодействуют с транскрипционным фактором Prox1 и модулируют его активность. С помощью различных функциональных тестов было установлено, что ген Prox1 занимает верхнюю ступень в иерархии регуляторных межгенных взаимоотношений, определяя принадлежность клеток к лимфоэндотелиальному дифференцировочному ряду [91]. Таким образом, Prox1 является мастер-регулятором экспрессии специфичных для лимфоэндотелия генов [92]. В свою очередь, ETS-2 необходим для Prox1-зависимой транскрипции гена VEGFR3-рецептора, отвечающего за миграцию лимфоэндотелиальных клеток по градиенту концентрации VEGF-C (рис. 4). Следовательно, стоит ожидать, что представители ETS-семейства будут одними из наиболее специфичных маркеров, характеризующих формирование лимфангиогенного фенотипа ЦИН при её трансформации в истинный рак. Дальнейшая расшифровка механизмов и последствий нарушения регуляции экспрессии ETS в ходе естественной прогрессии РШМ откроет новые возможности контролировать процессы метастазирования и прогнозировать индивидуальные риски развития вторичных опухолевых очагов.

## 5. ДРУГИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ АНГИОГЕНЕЗА И ЛИМФАНГИОГЕНЕЗА ПРИ РШМ

По мере углубления знаний о молекулярных механизмах ангиогенеза становится всё более очевидным то, что процессы роста и дифференцировки новых сосудов контролируются одновременно несколькими, достаточно автономными сигнальными каскадами, что обеспечивает высокую пластичность всей регуляторной системы. Эта гибкость регуляторных механизмов, избыточность и лёгкая взаимозаменяемость отдельных их компонентов

является существенным обстоятельством, осложняющим использование антиангиогенной терапии. Селективное подавление какого-либо из сигнальных путей ангиогенеза вызывает компенсаторную активацию альтернативных механизмов [42]. Исследования так называемых “не-VEGF-зависимых” путей ангиогенеза при прогрессии ЦИН/РШМ только начинают развиваться. Ниже суммированы данные по некоторым из этих малоизученных механизмов.

#### 5.1. Трансформирующий фактор роста бета (TGF $\beta$ 1), его рецептор (TGF $\beta$ -R1) и ко-рецептор CD105 (эндоглин)

Роль TFG в прогрессии ЦИН/РШМ исследована преимущественно в контексте проблемы формирования иммуносупрессорного микроокружения, в то же время об участии данного цитокина в регуляции ангиогенеза при РШМ практически ничего не известно. Существенное увеличение экспрессии мРНК TGF $\beta$ 1 и достоверная корреляция с уровнем мРНК VEGF обнаружены при переходе от ЦИН1 к ЦИН2/3 [26]. Содержание мРНК TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ -R1 и VEGF достоверно различается между нормальным эпителием, ЦИН и РШМ [27]. Уровень экспрессии ко-рецептора CD105 на поверхности эндотелиальных клеток новообразованных капилляров коррелирует с их повышенной плотностью (MVD) при ЦИН3 и низкодифференцированном РШМ [13, 93]. Обнаружена ассоциация между стадией РШМ, плотностью CD105-позитивных сосудов, уровнем экспрессии TGF $\beta$ 1 и прогнозом выживаемости [93].

#### 5.2. Ангиопоэтины (Ang1, Ang2) и их рецепторы (Tie1, Tie2)

Ang/Tie-зависимый сигнальный путь играет ведущую роль в созревании первичных сосудов (в том числе при опухолевом ангиогенезе и лимфангиогенезе) и функционально дополняет VEGF/VEGFR-зависимые процессы. В связи с этим ангиопоэтины и Tie-рецепторы представляют большой интерес для разработки таргетных препаратов нового поколения, которые в комбинации с анти-VEGF агентами способны существенно повысить эффективность антиангиогенной терапии [94]. Вклад ангиопоэтинов в стимуляцию прогрессии РШМ и регуляцию морфогенеза опухолевых сосудов был показан Shim и соавт. с помощью Ang1-трансфицированных клеток HeLa, привитых мышам [95]. Для процессов естественного развития РШМ достоверные изменения уровня Ang1, Ang2 и соотношения Ang1/Ang2 выявлены в плазме крови больных инвазивным РШМ [96].

#### 5.3. Delta-like-4 (Dll4) / Notch-зависимый сигнальный путь

Представление о том, что в патологическом ангиогенезе Dll4/Notch-зависимый механизм играет не менее, а, возможно, и более важную роль, чем VEGF/VEGFR-путь, сформировалось совсем недавно [97]. Dll4 — эндотелий-специфичный

мембранный белок (Notch-лиганд), экспрессия которого повышается в зонах роста новых сосудов, где он контролирует их оптимальную степень ветвления. VEGF способен потенцировать Dll4-зависимый сигналинг в эндотелиальных клетках, в свою очередь, Dll4/Notch-путь модулирует экспрессию VEGFR. Предположительно, именно этой взаимосвязью может объясняться резистентность к анти-VEGF/VEGFR терапии (например, для больных раком яичников ответ на бевацизумаб или амплиберцепт был ассоциирован с низким исходным уровнем экспрессии Dll4) [98]. Dll4/Notch-регуляторная ось абсолютно не исследована при развитии РШМ, полностью отсутствует информация об экспрессии Dll-лигандов или Notch-рецепторов эндотелием сосудов РШМ. В то же время, включение Dll4/Notch-ингибиторов в состав комбинированных антиангиогенных препаратов вызывает всё больший интерес, в особенности после того как было показано, что блокада Dll4 приводит к усиленному, но непродуктивному ангиогенезу и подавлению роста опухоли у мышей в результате чрезмерного ветвления образующихся сосудов [98].

#### 5.4. Фактор роста фибробластов (bFGF, basic FGF)

Связываясь с FGF-рецепторами на поверхности эндотелиальных клеток, bFGF стимулирует их пролиферацию, миграцию и дифференцировку [99]. Влияние bFGF таким образом синергично действию VEGF-A. Активация FGF/FGFR-сигнального пути также вносит вклад в резистентность к VEGFR2-ингибиторам [99]. bFGF и VEGF-C тесно взаимодействуют в регуляции лимфангиогенеза при моделировании опухолевой прогрессии у мышей [100]. В отношении РШМ есть сообщения как об усилении экспрессии bFGF относительно нормы [30, 101], так и об уменьшении экспрессии [27]. Взаимосвязь уровня bFGF с экспрессией VEGF-A и плотностью CD31/CD105-позитивных сосудов при РШМ пока не подтверждается [30, 102].

#### 5.5. Гепатоцитарный фактор роста (HGF) и его рецептор (HGFR/c-Met)

HGF оказывает выраженный митогенный и антиапоптотический эффект на эндотелиальные клетки кровеносных и лимфатических сосудов, экспрессирующих его рецептор c-Met/HGFR [103]. Активация HGF/HGFR-каскада как в опухолевых клетках, так и в клетках эндотелия приводит к гиперэкспрессии компонентов VEGF-зависимого пути, компенсируя таким образом действие VEGF-ингибиторов [103]. Значение HGF-фактора в канцерогенезе и ангиогенезе РШМ фактически не исследовано. Относительно рецептора c-Met, есть данные об увеличении его экспрессии при инвазивном РШМ по сравнению с нормой и ЦИН, и о положительной корреляции с уровнем HIF-1 $\alpha$  [104], риском рецидива и продолжительностью жизни больных с РШМ IV стадии, что косвенно подтверждает важную роль HGF/c-Met-пути в лимфангиогенезе и метастазировании [105].



5.6. Тромбоцитарный фактор роста  
эндотелиальных клеток (PD-ECGF,  
тимидинфосфорилаза)

PD-ECGF – сильный ангиогенный фактор, стимулирующий хемотаксис эндотелиальных клеток [69]. Обнаружено, что по мере увеличения степени ЦИН уровень экспрессии PD-ECGF также увеличивается относительно нормального эпителия [106]. В образцах карциномы *in situ* и инвазивного РШМ содержание PD-ECGF выше, чем при ЦИН [107]. Экспрессия PD-ECGF в образцах РШМ IB-II стадий достоверно выше в случае поражения тазовых лимфоузлов метастазами, коррелирует с размерами опухоли, глубиной инвазии, микрососудистой плотностью и прогнозом [69, 108].

5.7. Подопланин (PDPN) – специфический маркер  
лимфангиогенеза при РШМ

Подопланин – муциноподобный трансмембранный белок, экспрессируемый клетками лимфоэндотелия, но не эндотелия кровеносных сосудов [109]. Подопланин широко используется в качестве гистологического маркера лимфатических сосудов; предполагается, что этот белок играет важную роль в регуляции миграции лимфоэндотелиальных клеток и их адгезии к межклеточному матриксу, в осуществлении их взаимодействий с опухолевыми клетками и, соответственно, в инвазии и метастазировании [109]. Согласно результатам иммуногистохимических исследований, PDPN-позитивные сосуды локализованы преимущественно в перитуморальных зонах РШМ IB-IIA стадий [110], их плотность положительно коррелирует с вероятностью рецидива заболевания. Экспрессия подопланина также регистрируется в самих клетках РШМ на инвазивном фронте опухоли, но не внутри опухолевой массы, её уровень коррелирует с инвазией в лимфатическое пространство и наличием метастазов [111]. При доброкачественных интраэпителиальных изменениях экспрессия PDPN ограничивается базальным слоем клеток, в образцах РШМ *in situ* уровень экспрессии существенно увеличивается. Подопланин является важным медиатором гетеротипических клеточных взаимодействий при прогрессии РШМ и может рассматриваться в качестве перспективного прогностического маркера [110, 111].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренные выше результаты исследований свидетельствуют о том, что при естественном развитии ЦИН/РШМ под воздействием онкогенных стимулов происходит перестройка клеточных программ, регулирующих ангиогенез и лимфангиогенез. По отдельным вопросам ещё остается много неразрешенных противоречий, вызванных, в первую очередь, высокой степенью гетерогенности объекта исследования. Тем не менее, в данной обзорной статье

мы попытались показать, что ЦИН и РШМ могут служить естественной, объективной, многоступенчатой моделью для изучения движущих факторов и механизмов (лимф)ангиогенеза на всех его этапах, начиная с формирования проангиогенного микроокружения. Необходимо подчеркнуть значимость исследований по проблеме опухоль-ассоциированного лимфангиогенеза. Проплиферация клеток лимфатического эндотелия активно протекает на этапе предрака (ЦИН, рак *in situ*) и при микроинвазивном РШМ [112] – наиболее часто диагностируемых онкопатологий шейки матки, что предоставляет возможности для изучения молекулярных “драйверов” лимфангиогенеза и лимфогенного метастазирования. Безусловно, при этом следует учитывать вирусную этиологию РШМ, с которой могут быть связаны некоторые особенности механизмов регуляции (лимф)ангиогенеза.

Множество аспектов проблемы РШМ-ассоциированного (лимф)ангиогенеза ещё предстоит исследовать. Так, например, не определено участие перицитов в обеспечении функционирования опухолевых сосудов; не известно, как влияет антиангиогенная терапия на плотность и функциональное состояние перицитарного пласта. По-прежнему недостаточно информации о роли иммунного инфильтрата и стромального компонента в стимуляции (лимф)ангиогенеза при ЦИН/РШМ. Не известно, задействован ли механизм васкулогенной мимикрии, то есть замещения эндотелия опухолевыми клетками, при прогрессии РШМ; не ясно, участвуют ли стволовые клетки костного мозга в формировании стенок капилляров РШМ [2]. С развитием методов анализа микроРНК(миРНК)-транскриптомов, для РШМ начинает постепенно разрабатываться вопрос о роли особой группы миРНК – так называемых ангио-миРНК и гипокси-миРНК [113]. Например, Huang и соавт. было обнаружено, что на этапе перехода от карциномы *in situ* к инвазивному РШМ утрачивается экспрессия эндотелий-специфичной миРНК-126, играющей важную роль в поддержании нормальной дифференцировки эндотелиальных клеток [114]. Развивается направление, посвященное анализу экспрессии эндогенных ингибиторов ангиогенеза и лимфангиогенеза при РШМ, среди которых наибольшее внимание уделяется гликопротеинам межклеточного матрикса тромбоспондина-1 и -2. В работе Wu и соавт. тромбоспондин-1 отводится роль естественной “изгороди” для проангиогенных факторов, секретируемых эпителиальными клетками. По мере прогрессии ЦИН1 в ЦИН3 и микрокарциному эта “изгородь” между цервикальным эпителием и стромой постепенно истончается и исчезает [115]. Актуальность изучения перечисленных явлений обусловлена не только фундаментальным интересом, но и практической необходимостью. С одной стороны, они во многом объясняют отсутствие ожидаемого успеха в использовании современных антиангиогенных препаратов, действующих на единичные молекулярные мишени, а с другой



стороны, расшифровка альтернативных путей ангиогенеза/лимфангиогенеза открывает возможности для дальнейшего поиска принципиально новых подходов к таргетной противоопухолевой терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ №НК-14-04-32098\14, Правительства РФ №11.G34.31.0052 (Постановление 220) и Министерства образования и науки РФ (Госзадание на НИР).

## ЛИТЕРАТУРА

- Vailhé B., Vittet D., Feige J.J. (2001) *Lab. Invest.*, **81**(4), 439-452.
- Welti J., Loges S., Dimmeler S., Carmeliet P. (2013) *J. Clin. Invest.*, **123**(8), 3190-3200.
- Doorbar J., Quint W., Banks L., Bravo I.G., Stoler M., Broker T.R., Stanley M.A. (2012) *Vaccine*, **30**(S5), F55-F70.
- Gius D., Funk M.C., Chuang E.Y., Feng S., Huettner P.C., Nguyen L., Bradbury C.M., Mishra M., Gao S., Buttin B.M., Cohn D.E., Powell M.A., Horowitz N.S., Whitcomb B.P., Rader J.S. (2007) *Cancer Res.*, **67**(15), 7113-7123.
- Branca M., Giorgi C., Santini D., Bonito L., Ciotti M., Benedetto A., Paba P., Costa S., Bonifacio D., Bonito P., Accardi L., Favalli C., Syrjanen K., HPV-Pathogen ISS Study Group (2006) *J. Clin. Pathol.*, **59**(1), 40-47.
- Biedka M., Makarewicz R., Kopczyńska E., Marszałek A., Goralewska A., Kardymowicz H. (2012) *Contemp. Oncol. (Pozn.)*, **16**(1), 6-11.
- Gomes F.G., Nedel F., Alves A.M., Nör J.E., Tarquinio S.B. (2013) *Life Sci.*, **92**(2), 101-117.
- Shibuya M. (2013) *J. Biochem.*, **153**(1), 13-19.
- Tang X., Zhang Q., Nishitani J., Brown J., Shi S., Le A.D. (2007) *Clin. Cancer Res.*, **13**(9), 2568-2576.
- Kim S.H., Juhnn Y.S., Kang S., Park S.W., Sung M.W., Bang Y.J., Song Y.S. (2006) *Cell Mol. Life Sci.*, **63**(7-8), 930-938.
- Lopez-Ocejo O., Vilorio-Petit A., Bequet-Romero M., Mukhopadhyay D., Rak J., Kerbel R. (2000) *Oncogene*, **19**(40), 4611-4620.
- Chen W., Li F., Mead L., White H., Walker J., Ingram D.A., Roman A. (2007) *Virology*, **367**(1), 168-174.
- Stepan D., Simionescu C., Stepan A., Muntean M., Voinea B. (2012) *Rom. J. Morphol. Embryol.*, **53**(3), 585-589.
- Van Trappen P.O., Steele D., Lowe D.G., Baithun S., Beasley N., Thiele W., Weich H., Krishnan J., Shepherd J.H., Pepper M.S., Jackson D.G., Sleeman J.P., Jacobs I.J. (2003) *J. Pathol.*, **201**(4), 544-554.
- Gombos Z., Xu X., Chu C.S., Zhang P.J., Acs G. (2005) *Clin. Cancer Res.*, **11**(23), 8364-8371.
- Su J.L., Yang P.C., Shih J.Y., Yang C.Y., Wei L.H., Hsieh C.Y., Chou C.H., Jeng Y.M., Wang M.Y., Chang K.J., Hung M.C., Kuo M.L. (2006) *Cancer Cell*, **9**(3), 209-223.
- Nagy V.M., Buiga R., Brie I., Todor N., Tudoran O., Ordeanu C., Virág P., Tarta O., Rus M., Bălăcescu O. (2011) *Rom. J. Morphol. Embryol.*, **52**(1), 53-59.
- Botting S.K., Fouad H., Elwell K., Rampy B.A., Salama S.A., Freeman D.H., Diaz-Arrastia C.R. (2010) *Transl. Oncol.*, **3**(3), 170-175.
- Ureña-Barillas D., Castro-Manrreza M., Castellanos E., Gutiérrez-Rodríguez M., Arciniega-Ruiz de Esparza O., García-Cebada J., Velázquez J.R., Flores-Reséndiz D., Hernández-Hernández D., Benítez-Bribiesca L. (2010) *Exp. Mol. Pathol.*, **89**(2), 190-196.
- Liu H., Yang Y., Xiao J., Yang S., Liu Y., Kang W., Li X., Zhang F. (2014) *Microvasc. Res.*, **93**, 1-8.
- Shalaby M.A., Hampson L., Oliver A., Hampson I. (2012) *J. Immunoassay Immunochem.*, **33**, 223-233.
- Srivastava S., Gupta A., Agarwal G.G., Natsu S.M., Uma S., Goel M.M., Srivastava A.N. (2009) *BioSci. Trends*, **3**(4), 144-150.
- Mitsuhashi A., Suzuka K., Yamazawa K., Matsui H., Seki K., Sekiya S. (2005) *Cancer*, **103**(4), 724-730.
- Kim N.S., Kang Y.J., Jo J.O., Kim H.Y., Oh Y.R., Kim Y.O., Jung M.H., Ock M.S., Cha H.J. (2011) *Pathol. Oncol. Res.*, **17**(3), 493-502.
- Carrero Y., Callejas D., Alana F., Silva C., Mindiola R., Mosquera J. (2009) *Cancer*, **115**(16), 3680-3688.
- Baritaki S., Sifakis S., Huerta-Yepez S., Neonakis I.K., Soufla G., Bonavida B., Spandidos D.A. (2007) *Int. J. Oncol.*, **31**(1), 69-79.
- Soufla G., Sifakis S., Baritaki S., Zafiroopoulos A., Koumantakis E., Spandidos D.A. (2005) *Cancer Lett.*, **221**(1), 105-118.
- Lee J.S., Kim H.S., Park J.T., Lee M.C., Park C.S. (2003) *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, **25**(6), 303-311.
- Michalski B., Zieliński T., Fila A., Mazurek U., Poreba R., Wilczok T. (2003) *Ginek. Pol.*, **74**(9), 805-810.
- Van Trappen P.O., Ryan A., Carroll M., Lecoeur C., Goff L., Gyselman V.G., Young B.D., Lowe D.G., Pepper M.S., Shepherd J.H., Jacobs I.J. (2002) *Br. J. Cancer*, **87**(5), 537-544.
- Lee I.J., Park K.R., Lee K.K., Song J.S., Lee K.G., Lee J.Y., Cha D.S., Choi H.I., Kim D.H., Deung Y.K. (2002) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **54**(3), 768-779.
- Cheng W.F., Chen C.A., Lee C.N., Wei L.H., Hsieh F.J., Hsieh C.Y. (2000) *Obstet. Gynecol.*, **96** (5 Pt 1), 721-726.
- Kodama J., Seki N., Tokumo K., Hongo A., Miyagi Y., Yoshinouchi M., Okuda H., Kudo T. (1999) *Eur. J. Cancer*, **35**(3), 485-489.
- Tokumo K., Kodama J., Seki N., Nakanishi Y., Miyagi Y., Kamimura S., Yoshinouchi M., Okuda H., Kudo T. (1998) *Gynecol. Oncol.*, **68**(1), 38-44.
- Liu Y.Q., Li H.F., Han J.J., Tang Q.L., Sun Q., Huang Z.Q., Li H.G. (2014) *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **15**(12), 5049-5053.
- Liu H., Xiao J., Yang Y., Liu Y., Ma R., Li Y., Deng F., Zhang Y. (2011) *Microvasc. Res.*, **82**(2), 131-140.
- Jach R., Dulinska-Litewka J., Laidler P., Szczudrawa A., Kopera A., Szczudlik L., Pawlik M., Zajac K., Mak M., Basta A. (2010) *Front. Biosci. (Elite Ed.)*, **2**, 411-423.
- Hashimoto I., Kodama J., Seki N., Hongo A., Yoshinouchi M., Okuda H., Kudo T. (2001) *Br. J. Cancer*, **85**(1), 93-97.
- Kuemmel S., Thomas A., Landt S., Fuger A., Schmid P., Kriner M., Blohmer J., Sehouli J., Schaller G., Lichtenegger W., Koninger A., Fuchs I. (2009) *Anticancer Res.*, **29**(2), 641-645.
- Bachtiary B., Selzer E., Knocke T.H., Pötter R., Obermair A. (2002) *Cancer Lett.*, **179**(2), 197-203.
- Lebrecht A., Ludwig E., Hunber A., Klein M., Schneeberger C., Tempfer C., Koelbl H., Hefler L. (2002) *Gynecol. Oncol.*, **85**(1), 32-35.
- Tewari K.S., Sill M.W., Long H.J. 3rd, Penson R.T., Huang H., Ramondetta L.M., Landrum L.M., Oaknin A., Reid T.J., Leitao M.M., Michael H.E., Monk B.J. (2014) *N. Engl. J. Med.*, **370**(8), 734-743.
- Seol H.J., Ulak R., Ki K.D., Lee J.M. (2014) *Tohoku J. Exp. Med.*, **232**(4), 269-276.

44. Schefter T., Winter K., Kwon J.S., Stuhr K., Balaraj K., Yaremko B.P., Small W. Jr., Sause W., Gaffney D., Radiation Therapy Oncology Group (2014) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **88**(1), 101-105.
45. Monk B.J., Mas Lopez L., Zarba J.J., Oaknin A., Tarpin C., Termrungruangler W., Alber J.A., Ding J., Stutts M.W., Pandite L.N. (2010) *J. Clin. Oncol.*, **28**(22), 3562-3569.
46. Mackay H.J., Tinker A., Winkvist E., Thomas G., Swenerton K., Oza A., Sederias J., Ivy P., Eisenhauer E.A. (2010) *Gynecol. Oncol.*, **116**(2), 163-167.
47. Porta C., Paglino C., Mosca A. (2014) *Front. Oncol.*, **4**, 64.
48. Spangle J.M., Munger K. (2010) *J. Virol.*, **84**(18), 9398-9407.
49. Tinker A.V., Ellard S., Welch S., Moens F., Allo G., Tsao M.S., Squire J., Tu D., Eisenhauer E.A., MacKay H. (2013) *Gynecol. Oncol.*, **130**(2), 269-274.
50. Eskander R.N., Tewari K.S. (2014) *J. Gynecol. Oncol.*, **25**(3), 249-259.
51. Bruns A.F., Yuldasheva N., Latham A.M., Bao L., Pellet-Many C., Frankel P., Stephen S.L., Howell G.J., Wheatcroft S.B., Kearney M.T., Zachary I.C., Ponnambalam S. (2012) *PLoS One*, **7**(11), e48539.
52. Landt S., Wehling M., Heidecke H., Jeschke S., Korlach S., Stoblen F., Schmid P., Blohmer J.U., Lichtenegger W., Sehoul J., Kummel S. (2011) *Anticancer Res.*, **31**(8), 2589-2595.
53. Seshacharyulu P., Ponnusamy M.P., Haridas D., Jain M., Ganti A.K., Batra S.K. (2012) *Exp. Opin. Ther. Targets*, **16**(1), 15-31.
54. van Crujisen H., Giaccone G., Hoekman K. (2005) *Int. J. Cancer*, **117**(6), 883-888.
55. Soonthornthum T., Arias-Pulido H., Joste N., Lomo L., Muller C., Rutledge T., Verschraegen C. (2011) *Ann. Oncol.*, **22**(10), 2166-2178.
56. Spangle J.M., Munger K. (2013) *PLoS Patog.*, **9**(3), e1003237.
57. Akerman G.S., Tolleson W.H., Brown K.L., Zyzak L.L., Mourateva E., Engin T.S., Basaraba A., Coker A.L., Creek K.E., Pirisi L. (2001) *Cancer Res.*, **61**(9), 3837-3843.
58. Sizemore N., Choo C.K., Eckert R.L., Rorke E.A. (1998) *Exp. Cell. Res.*, **244**(1), 349-356.
59. Li Q., Tang Y., Cheng X., Ji J., Zhang J., Zhou X. (2014) *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **7**(2), 733-741.
60. Conesa-Zamora P., Torres-Moreno D., Isaac M.A., Perez-Guillermo M. (2013) *Exp. Mol. Pathol.*, **95**(2), 151-155.
61. Iida K., Nakayama K., Rahman M.T., Rahman M., Ishikawa M., Katagiri A., Yeasmin S., Otsuki Y., Kobayashi H., Nakayama S., Miyazaki K. (2011) *Br. J. Cancer*, **105**(3), 420-427.
62. Fukazawa E.M., Baiocchi G., Soares F.A., Kumagai L.Y., Faloppa C.C., Badiglian-Filho L., Coelho F.R., Gonçalves W.J., Costa R.L., Goes J.C. (2014) *Int. J. Gynecol. Pathol.*, **33**(3), 225-234.
63. Balan R., Simion N., Giusca S.E., Grigoras A., Gheuca-Solovastru L., Gheorghita V., Amalinei C., Caruntu I.D. (2011) *Rom. J. Morphol. Embryol.*, **52**(4), 1187-1194.
64. Fuchs I., Vorsteher N., Buhler H., Evers K., Sehoul J., Schaller G., Kummel S. (2007) *Anticancer Res.*, **27**(2), 959-963.
65. Semenza G.L. (2013) *J. Clin. Invest.*, **123**(9), 3664-3671.
66. Cuninghame S., Jackson R., Zehbe I. (2014) *Virology*, **456-457**, 370-383.
67. Bodily J.M., Mehta K.P., Laimins L.A. (2011) *Cancer Res.*, **71**(3), 1187-1195.
68. Roszak A., Kedzia W., Malkowska-Walczak B., Pawlik P., Kedzia H., Luczak M., Lianeri M., Jagodzinski P.P. (2011) *Biomed. Pharmacother.*, **65**(4), 298-302.
69. Fujimoto J., Alam S.M., Jahan I., Sato E., Toyoki H., Hong B.L., Sakaguchi H., Tamaya T. (2006) *Cancer Sci.*, **97**(9), 861-867.
70. Birner P., Schindl M., Obermair A., Plank C., Breiteneker G., Oberhuber G. (2000) *Cancer Res.*, **60**(17), 4693-4696.
71. No J.H., Jo H., Kim S.H., Park I.A., Kang D., Han S.S., Kim J.W., Park N.H., Kang S.B., Song Y.S. (2009) *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, **1171**, 105-110.
72. Mayer A., Wree A., Hockel M., Leo C., Pilch H., Vaupel P. (2004) *Cancer Res.*, **64**(16), 5876-5881.
73. Bachtary B., Schindl M., Potter R., Dreier B., Knocke T.H., Hainfellner J.A., Horvat R., Birner P. (2003) *Clin. Cancer Res.*, **9**(6), 2234-2240.
74. Burri P., Djonov V., Aebersold D.M., Lindel K., Studer U., Altermatt H.J., Mazzucchelli L., Greiner R.H., Gruber G. (2003) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **56**(2), 494-501.
75. Ishikawa H., Sakurai H., Hasegawa M., Mitsuhashi N., Takahashi M., Masuda N., Nakajima M., Kitamoto Y., Saitoh J., Nakano T. (2004) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **60**(2), 513-521.
76. Niibe Y., Watanabe J., Tsunoda S., Arai M., Arai T., Kawaguchi M., Matsuo K., Jobo T., Ono S., Numata A., Unno N., Hayakawa K. (2010) *Eur. J. Gynaecol. Oncol.*, **31**(5), 491-496.
77. Dellas K., Bache M., Pigorsch S.U., Taubert H., Kappler M., Holzapfel D., Zorn E., Holzhausen H.J., Haensgen G. (2008) *Strahlenther Onkol.*, **184**(3), 169-174.
78. Koh M.Y., Powis G. (2012) *Trends Biochem. Sci.*, **37**(9), 364-372.
79. Kim M.K., Kim T.J., Sung C.O., Choi C.H., Lee J.W., Bae D.S., Kim B.G. (2011) *J. Gynecol. Oncol.*, **22**(1), 44-48.
80. Burroughs S.K., Kaluz S., Wang D., Wang K., Van Meir E.G., Wang B. (2013) *Future Med. Chem.*, **5**(5), 553-572.
81. Baranello L., Bertozzi D., Fogli M.V., Pommier Y., Capranico G. (2010) *Nucleic Acids Res.*, **38**(1), 159-171.
82. Zigelboim I., Wright J.D., Gao F., Case A.S., Massad L.S., Mutch D.G., Powell M.A., Thaker P.H., Eisenhauer E.L., Cohn D.E., Valea F.A., Alvarez Secord A., Lippmann L.T., Dehdashti F., Rader J.S. (2013) *Gynecol. Oncol.*, **130**(1), 64-68.
83. Randi A.M., Sperone A., Dryden N.H., Birdsey G.M. (2009) *Biochem. Soc. Trans.*, **37**(Pt 6), 1248-1253.
84. Popescu N., Zimonjic D., Simpson S., DiPaolo J. (1995) *Int. J. Oncol.*, **7**(2), 279-285.
85. Simpson S., Woodworth C.D., DiPaolo J.A. (1997) *Oncogene*, **14**(18), 2149-2157.
86. Петров С.В., Мазуренко Н.Н., Сухова Н.М., Мороз И.П., Каценельсон В.М., Райхлин Н.Т., Киселев Ф.Л. (1994) *Архив патол.*, **56**(4), 22-31.
87. Xu F.L., Li Y.L., Wang Z.D., Feng Y.J. (2003) *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, **25**(4), 396-400.
88. Fujimoto J., Aoki I., Toyoki H., Khatun S., Tamaya T. (2002) *Ann. Oncol.*, **13**(10), 1598-1604.
89. Oettgen P. (2010) *J. Oncol.*, 767384.
90. Yoshimatsu Y., Yamazaki T., Mihira H., Itoh T., Suehiro J., Yuki K., Harada K., Morikawa M., Iwata C., Minami T., Morishita Y., Kodama T., Miyazono K., Watabe T. (2011) *J. Cell. Sci.*, **124**(Pt 16), 2753-2762.
91. Chan S.S., Kyba M. (2013) *J. Stem Cell Res. Ther.*, **3**, e114.

92. Francois M., Harvey N.L., Hogan B.M. (2011) *Physiology* (Bethesda), **26**(3), 146-155.
93. Lin H., Huang C.C., Ou Y.C., Huang E.Y., Changchien C.C., Tseng C.W., Fu H.C., Wu C.H., Li C.J., Ma Y.Y. (2012) *Int. J. Gynecol. Pathol.*, **31**(5), 482-489.
94. Gerald D., Chintharlapalli S., Augustin H.G., Benjamin L.E. (2013) *Cancer Res.*, **73**(6), 1649-1657.
95. Shim W.S., Teh M., Bapna A., Kim I., Koh G.Y., Mack P.O., Ge R. (2002) *Exp. Cell Res.*, **279**(2), 299-309.
96. Kopczyńska E., Makarewicz R., Biedka M., Kaczmarczyk A., Kardymowicz H., Tyrakowski T. (2009) *Eur. J. Gynaecol. Oncol.*, **30**(6), 646-649.
97. Liu Z., Fan F., Wang A., Zheng S., Lu Y. (2014) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **140**(4), 525-536.
98. Thanappapras D., Hu W., Sood A.K., Coleman R.L. (2012) *Curr. Pharm. Des.*, **18**(19), 2713-2719.
99. Korc M., Friesel R.E. (2009) *Curr. Cancer Drug Targets*, **9**(5), 639-651.
100. Cao R., Ji H., Feng N., Zhang Y., Yang X., Andersson P., Sun Y., Tritsaris K., Hansen A.J., Dissing S., Cao Y. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**(39), 15894-15899.
101. Fujimoto J., Ichigo S., Hori M., Hirose R., Sakaguchi H., Tamaya T. (1997) *Cancer Lett.*, **111**(1-2), 21-26.
102. Zijlmans H.J., Fleuren G.J., Hazelbag S., Sier C.F., Dreef E.J., Kenter G.G., Gorter A. (2009) *Br. J. Cancer*, **100**(10), 1617-1626.
103. You W.K., McDonald D.M. (2008) *BMB Rep.*, **41**(12), 833-839.
104. Kim B.W., Cho H., Chung J.Y., Conway C., Ylaya K., Kim J.H., Hewitt S.M. (2013) *J. Transl. Med.*, **11**, 185.
105. Baykal C., Ayhan A., Al A., Yüce K., Ayhan A. (2003) *Gynecol. Oncol.*, **88**(2), 123-129.
106. Короленкова Л.И., Степанова Е.В., Ермилова В.Д., Барышников А.Ю., Брюзгин В.В. (2011) *Вопр. онкол.*, **57**(2), 199-203.
107. Isaka S., Sawai K., Tomiie M., Kamiura S., Koyama M., Azuma C., Ishiguro S., Murata Y., Saji F. (2002) *Int. J. Oncol.*, **21**(2), 281-287.
108. Kodama J., Yoshinouchi M., Seki N., Hongo A., Miyagi Y., Kudo T. (1999) *Int. J. Oncol.*, **15**(1), 149-154.
109. Wicki A., Christofori G. (2007) *Br. J. Cancer*, **96**(1), 1-5.
110. Xiong Y., Cao L.P., Rao H.L., Cai M.Y., Liang L.Z., Liu J.H. (2012) *Cell Tissue Res.*, **348**(3), 515-522.
111. Dumoff K.L., Chu C., Xu X., Pasha T., Zhang P.J., Acs G. (2005) *Mod. Pathol.*, **18**(1), 97-104.
112. Cimpean A.M., Mazuru V., Cernii A., Ceausu R., Saptefrati L., Cebanu A., Fit A.M., Raica M. (2011) *Pathol. Int.*, **61**(7), 395-400.
113. Matejuk A., Collet G., Nadim M., Grillon C., Kieda C. (2013) *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, **61**(4), 285-299.
114. Huang T.H., Chu T.Y. (2014) *Oncogene*, **33**(28), 3636-3647.
115. Wu M.P., Tzeng C.C., Wu L.W., Huang K.F., Chou C.Y. (2004) *Cancer J.*, **10**(1), 27-32.

Поступила: 05. 11. 2014.

## REMODELING OF ANGIOGENESIS AND LYMPHANGIOGENESIS IN CERVICAL CANCER DEVELOPMENT

*O.V. Kurmyshkina, L.L. Belova, P.I. Kovchur, T.O. Volkova*

Institute of High-Tech Biomedicine, Petrozavodsk State University,  
33 Lenin str., Petrozavodsk, 185910 Russia; tel.: (8142) 78-46-97, fax: (8142) 71-10-00;  
e-mail: VolkovaTO@yandex.ru

Ability to stimulate angiogenesis/lymphangiogenesis is recognized as an inherent feature of cancer cells providing necessary conditions for their growth and dissemination. "Angiogenic switch" is one of the earliest consequences of malignant transformation that encompasses a great number of genes and triggers a complex set of signaling cascades in endothelial cells. The processes of tumor microvasculature development are closely connected to the steps of carcinogenesis (from benign lesions to invasive forms) and occur through multiple deviations from the norm. Analysis of expression of proangiogenic factors at successive steps of cervical cancer development (intraepithelial neoplasia, cancer *in situ*, microinvasive, and invasive cancer) enables to reconstruct the regulatory mechanisms of (lymph-)angiogenesis and to discriminate the most important components. This review presents detailed analysis of literature data on expression of the key regulators of angiogenesis in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. Their possible involvement in molecular mechanisms of neoplastic transformation of epithelial cells, as well as invasion and tumor metastasis is discussed. Correlation between expression of proangiogenic molecular factors and various clinicopathological parameters is considered, the potential of their use in molecular diagnostics and targeted therapy of cervical cancer is reviewed. Particular attention is paid to relatively poorly studied regulators of lymphangiogenesis and "non-VEGF dependent", or alternative, angiogenic pathways that constitute the prospect of future research in the field.

**Key words:** angiogenesis, lymphangiogenesis, cervical cancer, intraepithelial neoplasia, vascular growth factors, transcription factors