

ФАКТОР РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ И ОПУХОЛИ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ. ЧАСТЬ 1. РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**Е.С. Герштейн, Д.Н. Кушлинский, И.В. Терешкина, В.Д. Ермилова,
Л.К. Овчинникова, Д.Э. Галдава, О.В. Кузнецова**

ФГБНУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАНМ, Москва

Представлены результаты собственных исследований и наиболее значимые данные литературы, свидетельствующие о том, что ключевой положительный регулятор неангиогенеза — фактор роста эндотелия сосудов (vegf) — клинически значимый прогностический фактор при различных онкологических заболеваниях, а также мишень современных таргетных препаратов с различным механизмом действия. Его роль в качестве серологического маркера для диагностики и мониторинга требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: фактор роста эндотелия сосудов (vegf), рецепторы vegf, ангиогенез, опухоли человека, прогноз.

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND THE TUMORS OF FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM. PART I. BREAST CANCER

**E.S. Gershteyn, D.N. Koushliniski, I.V. Tereshkina, V.D. Ermilova,
L.K. Ovchinnikova, D.E. Galdava, O.V. Kouznetsova**

Federal State Budget Scientific Institution «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow

The article presents the results of the authors' own research and the most compelling literature data, certifying that the key positive regulator of neoangiogenesis — vascular endothelial growth factor (VEGF) — is a clinically significant prognostic factor in different types of oncologic diseases and is a target for the modern drugs with various mechanisms of action as well. The role of VEGF as a serological marker for the diagnosis and monitoring requires further investigation.

Key words: vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors, angiogenesis, human tumors, prognosis.

Ангиогенез — процесс ответвления новых капиллярных отростков от уже существующих кровеносных сосудов и включает, по крайней мере, четыре стадии: протеолитическое разрушение базальной мембраны сосудов и межклеточного матрикса, миграцию и прикрепление эндотелиальных клеток, их пролиферацию и, наконец, формирование тубулярных структур.

Не вызывает сомнения тот факт, что уже на ранних стадиях опухоль не может развиваться и расти без образования в ней разветвленной сети сосудов, обеспечивающих снабжение клеток кислородом и питательными веществами.

В регуляции ангиогенеза тем или иным образом участвуют многие известные факторы роста и цитокины, однако важнейшим положительным регулятором ангиогенеза бесспорно является фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor — VEGF).

Уникальность этого белка заключается в том, что в отличие от всех других факторов роста, он митогенен только по отношению к эндотелиальным клеткам, но возможно его аутокринное воздействие VEGF на продуцирующие его опухолевые клетки.

VEGF — это гомодимерный, сильно гликозилированный белок с молярной массой 46–48 кДа, существующий, по крайней мере, в пяти изоформах, обладающих сходной биологической активностью, но существенно отличающихся по биологической доступности [17]. Биологическая доступность VEGF во многом определяется размером молекулы и регулируется на генетическом уровне при альтернативном сплайсинге мРНК, а также эпигеномно при протеолитическом расщеплении синтезированных молекул с участием системы активации плазминогена. На поверхности эндотелиальных клеток

три рецептора для VEGF, являющихся типичными рецепторными тирозинкиназами. Рецептор VEGF первого типа (VEGFR1) — продукт гена *flt-1*, рецептор второго типа (VEGFR2) получил название KDR и является человеческим гомологом продукта мышинового гена *flk-1* и, наконец, рецептор третьего типа (VEGFR3) — продукт гена *flt-4*. Все рецепторы представляют собой трансмембранные гликопротеиды с молярной массой 170–235 кДа. Для эффективно-го связывания VEGF с рецепторами необходимо его взаимодействие с гепарино-подобными компонентами внеклеточного матрикса.

Ключевым регулятором роста кровеносных сосудов, в том числе и в опухолевой ткани, является VEGF A, но существуют еще несколько членов семейства VEGF — VEGF-B, C, D и E. Наиболее четко определена к настоящему времени функция VEGF-C: считается, что он стимулирует лимфоангиогенез, взаимодействуя с VEGFR3, расположенными на клетках эндотелия лимфатических сосудов. Основными растворимыми формами VEGF A являются молекулы размером 121 и 165 аминокислотных остатков, они же являются и основными биологически активными формами VEGF. Считается, что в тканях основной изоформой VEGF является VEGF-165.

Помимо общего для большинства рецепторных киназ митоген-активируемого протеинкиназного каскада, регулирующего экспрессию генов, связанных с пролиферацией, к числу важнейших генов, регулируемых VEGF в эндотелиальных клетках, относится протоонкоген *c-ets-1*, кодирующий транскрипционный фактор Ets-1. Исследования с использованием гибридизации *in situ* показали, что *c-ets-1* экспрессируется в эндотелиальных клетках на ранних стадиях формирования кровеносных сосудов [46]. Его продукт Ets-1 способствует проявлению ангиогенного фенотипа этих клеток, активируя транскрипцию генов и последующий синтез белков важнейших протеаз, расщепляющих внеклеточный матрикс (ВКМ), — активатора плазминогена урокиназного типа, стромелизина, коллагеназы 1, ММП-1, 3 и 9, а также β_2 -интегрина [40]. Активация протеаз имеет три важных для стимуляции ангиогенеза последствия: облегчает дезинтеграцию эндотелиальных клеток и их инвазию в базальный

слой сосудов, генерирует продукты деградации ВКМ, способствующие хемотаксису эндотелиальных клеток, а также активирует и мобилизует находящиеся в ВКМ факторы роста.

Клиническое значение определения VEGF и его рецепторов у больных опухолями женской репродуктивной системы

В лаборатории клинической биохимии РОНЦ им. Н.Н. Блохина проводятся исследования клинического значения определения VEGF и его рецепторов второго типа в опухолях и сы-воротке крови больных злокачественными новообразованиями органов женской репродуктивной системы и их потенциального значения в качестве диагностических и прогностических маркеров. Рассмотрим некоторые наиболее значимые результаты наших исследований в сопоставлении с данными литературы о фундаментальной и клинической роли VEGF-сигнальной системы при опухолях женской репродуктивной системы.

Рак молочной железы

Первые доказательства взаимосвязи экспрессии VEGF с активностью ангиогенеза в опухолях молочной железы были получены на клиническом материале и опубликованы в 1994–96 гг. группой японских исследователей [43–45]. Интересные данные были получены также Н. Yoshiji et al [50]. Используя иммуногистохимический метод, они сравнили экспрессию VEGF, VEGFR1, также оФРФ и α - и β -ТФР в РМЖ и окружающей неизменной ткани молочной железы. Оказалось, что из всех исследованных показателей только экспрессия VEGF существенно увеличена в опухолевых клетках по сравнению с нормальными. Увеличение экспрессии VEGF в ткани РМЖ по сравнению с неопухолевым тканью молочной железы было продемонстрировано также методами РНК-гибридизации [10, 23]. Все эти исследования послужили первыми свидетельствами в пользу важной роли VEGF в неоангиогенезе при РМЖ и его значения для роста опухолей.

Для более прямого доказательства этой гипотезы требовались экспериментальные исследования, подтверждающие влияние VEGF, продуцируемого клетками РМЖ, на ангиогенез.

Эти доказательства подробно рассмотрены в нашем обзоре [5].

Классическая модель регуляции ангиогенеза в РМЖ (также, как в любой другой опухоли) предусматривает наличие паракринной системы, в которой фактор роста (VEGF) продуцируется опухолевыми клетками, а его рецепторы, воспринимающие сигнал, находятся на клетках эндотелия сосудов. Существование подобной паракринной системы при РМЖ хорошо иллюстрируется данными L.F. Brown et al [12], исследовавших методом РНК-гибридизации *in situ* образцы тканей 68 больных РМЖ и показавших, что в клетках инвазивной, метастатической и внутрипротоковой карциномы молочной железы отмечается выраженная экспрессия VEGF, а в клетках эндотелия сосудов, пронизывающих эти опухоли, — выраженная экспрессия VEGFR1 и VEGFR2. Аналогичные результаты получены и A. Kranz et al [27], однако эти авторы обнаружили VEGFR2 также и на клетках эпителия протоков молочной железы. Есть и другие свидетельства того, что на клетках РМЖ находятся рецепторы VEGF [8, 34, 37], причем уровень экспрессии VEGF и VEGFR2 коррелирует с индексом пролиферации опухолевых клеток, определяемым по экспрессии антигена Ki-67 [47]. Показано, что как опухолевые, так и стромальные клетки, выделенные из первичных карцином молочной железы человека, продуцируют VEGF *in vitro*, и уровень его продукции значительно выше, чем у соответствующих клеток, выделенных из нормальной молочной железы [42]. При этом методом ПЦР анализа продемонстрировано, что в опухолевых клетках преобладает VEGFR2, а в стромальных клетках экспрессируется только VEGFR1. Таким образом, помимо своей прямой функции — стимуляции неоангиогенеза, VEGF при РМЖ может играть также и роль ауто/паракринного регулятора пролиферации опухолевых и/или стромальных клеток.

В сравнительном иммуноферментном исследовании, включавшем 39 больных РМЖ, нам удалось продемонстрировать увеличение уровня VEGF и его рецепторов первого и второго типов в опухолях больных раком молочной железы по сравнению с окружающими гистологически неизмененными тканями [6]. Уже на ранних стадиях заболевания мы наблю-

дали способность опухоли к повышенной продукции VEGF и, по-видимому, его рецептора первого типа, что, по мнению многих авторов, является показателем плохого прогноза заболевания и высокого риска образования метастазов. Обнаруженная достоверная корреляция показателей содержания VEGF в опухолевой ткани с уровнями VEGFR1 и VEGFR2 может указывать на возможную коэкспрессию некоторых компонентов VEGF-сигнального пути в клетках рака молочной железы. Таким образом, результаты нашего исследования косвенно свидетельствуют о координированной активации VEGF-зависимых механизмов в опухоли.

В регуляции экспрессии VEGF в клетках РМЖ участвуют различные факторы роста и сигнальные системы. В нескольких исследованиях продемонстрирована, в частности, важная роль семейства рецепторных тирозинкиназ *erbB* и некоторых их лигандов [11, 28, 29, 50]. Вопрос о гормональной регуляции синтеза VEGF в клетках РМЖ половыми стероидами, в особенности эстрогенами, остается спорным. Хотя индукция эстрогенами VEGF-опосредованного ангиогенеза в эндометрии практически не вызывает сомнений [25], существование аналогичного механизма при РМЖ четко не доказано. Участие РЭ в регуляции синтеза VEGF в клетках РМЖ подтверждается и молекулярно-биологическими исследованиями [24], продемонстрировавшими, что в составе гена VEGF находятся две последовательности, гомологичные классическим эстроген-чувствительным элементам и специфически связывающие обе формы РЭ — РЭ- α и РЭ- β . Тем не менее, характер действия эстрогенов и антиэстрогенов на синтез VEGF, по-видимому, зависит от типа клеток РМЖ.

Интересные закономерности, касающиеся гормональной регуляции ангиогенеза в молочной железе, были продемонстрированы [22]. Исследовав методом ПЦР-анализа экспрессию основных изоформ VEGF-A в опухолях и окружающих неизмененных тканях молочной железы 19 больных РМЖ, они обнаружили, что уровни экспрессии VEGF в неизменной железе достоверно выше у больных в пременопаузе, чем у больных в постменопаузе, и достоверно снижаются с увеличением возраста больных. В то же время экспрессия VEGF в опухолевой

ткани не зависела от возраста и менопаузного статуса больных. Авторы полагают, что в нормальной молочной железе ангиогенез находится под гормональным контролем, а при злокачественной трансформации этот контроль утрачивается.

Мы также обнаружили взаимосвязь экспрессии VEGF и VEGFR2 с рецепторным статусом опухоли: уровни VEGF и VEGFR2 были повышены в РП-отрицательных опухолях, наблюдалась также тенденция к увеличению содержания VEGF в РЭ-отрицательных образцах [6]. По-видимому, в клинических условиях утрата опухолью гормональной зависимости может быть ассоциирована с повышенной продукцией ангиогенных факторов и их рецепторов. Отсутствие взаимосвязи между показателями тканевой экспрессии двух типов рецепторов VEGF и возможные различия в их гормональной регуляции подтверждают высказанные ранее предположения о разной роли VEGFR1 и VEGFR2 в ангиогенезе и опухолевом росте.

В другом исследовании, включавшем 30 больных РМЖ [3, 4], мы не выявили достоверных корреляций между показателями VEGF и VEGFR2 в сыворотке крови и в ткани опухоли, что может свидетельствовать о различных источниках поступления этих ангиогенных факторов в сыворотку крови. При этом опухолевая экспрессия VEGFR2 была взаимосвязана с такими неблагоприятными факторами, как гиперэкспрессия HER2 и наличие раковых эмболов по периферии опухоли. Предоперационная терапия влияла на уровни VEGF и VEGFR2 как в крови, так и в ткани опухоли, однако направление и степень изменений достоверно не зависели от вида лечения.

В целом, по нашим данным, VEGF и его рецепторы — достаточно перспективные биомаркеры рака молочной железы не только в качестве классических показателей опухолевого ангиогенеза, но и в качестве возможных факторов неблагоприятного прогноза гормонотерапии.

Таким образом, VEGF играет при РМЖ важную и многообразную роль, стимулируя рост и распространение опухоли посредством комплексных паракринных и аутокринных воздействий как непосредственно на эндотелий кровеносных сосудов, так и на клетки опухолей и опухолевой стромы, инфильтрирующие опу-

холь макрофаги и клетки лимфатических сосудов. Все это позволяет рассматривать VEGF как весьма перспективный биологический маркер для прогноза РМЖ и одну из главных мишеней антиангиогенной противоопухолевой терапии.

Всего по результатам анализа базы данных Medline исследование клинического значения тканевого уровня VEGF при РМЖ проводилось 14 группами исследователей. Практически все исследователи, проводившие подобные сравнения, независимо от использовавшихся методов, отмечают увеличение экспрессии VEGF в ткани РМЖ по сравнению с окружающей гистологически неизменной тканью молочной железы [1, 4, 6, 9, 23, 36, 41, 50], также с доброкачественными опухолями [36]. Нет противоречий и в вопросе о прямой корреляции уровня экспрессии VEGF с активностью неоангиогенеза в опухолевой ткани.

Впервые неблагоприятное прогностическое значение высокой экспрессии VEGF при РМЖ было отмечено M. Toi et al [43, 44], а позднее подтверждено M. Relf et al [37]. Однако наиболее интересными следует признать исследования, в которых прогностическое значение VEGF оценивалось в различных клинических группах больных РМЖ с учетом проводимого лечения. Результаты такого детального анализа опубликованы двумя группами G. Gasparini et al [19–21] и B. Linderholm et al [29–33]. По данным, обобщенным в нескольких обзорных статьях [19, 20, 35], VEGF — наиболее перспективный в прогностическом плане показатель активности ангиогенеза при РМЖ. Его высокий уровень свидетельствует о неблагоприятном прогнозе как при раннем, так и при распространенном РМЖ.

Прогностическое значение VEGF при нераспространенном РМЖ исследовано и подтверждено также в работе [32]. Авторы определили иммуноферментным методом содержание VEGF в цитозолях опухолей у 525 больных без метастазов в лимфатических узлах ($T_{1-2}N_0M_0$), 500 из которых не получали никакого послеоперационного лечения. Выживаемость больных с цитозольной концентрацией VEGF ниже медианного уровня (2,40 пг/мкг ДНК) была достоверно выше, чем у больных с более низким уровнем VEGF. При многофакторном анализе уровень VEGF оказался наиболее значимым

независимым прогностическим фактором, превосходящим другие известные показатели. Достоверное снижение выживаемости при высоком уровне VEGF в опухоли обнаружено и в прогностически благоприятной группе РЭ-положительных больных.

По данным этих же авторов [31], высокий уровень VEGF имеет неблагоприятное прогностическое значение и при проведении больным ранними стадиями РМЖ местнорегиональной лучевой терапии. Они обследовали также группу из 362 больных РМЖ с метастазами в лимфатические узлы, 250 из которых получали адъювантную гормонотерапию и 112 — адъювантную химиотерапию [8, 30]. При однофакторном анализе VEGF оказался достоверным фактором прогноза безрецидивной и общей выживаемости во всей популяции больных, а также в группе, получавшей эндокринную терапию. В группе больных, получавших химиотерапию, уровень VEGF оказывал влияние только на общую выживаемость. При многофакторном анализе VEGF сохранял свое значение только для общей выживаемости. Таким образом, эта группа исследователей также продемонстрировала прогностическую значимость VEGF для различных клинических групп больных РМЖ.

В кооперированном исследовании [16], включавшем суммарно 495 больных из двух различных клиник, на основании данных однофакторного и многофакторного анализа, включавшего наряду с традиционными показателями также ангиогенин, основной фактор роста фибробластов и активаторы плазминогена, было показано, что VEGF — наиболее важный прогностический параметр для больных РМЖ без метастазов в лимфатические узлы. Еще одна группа исследователей [14] подтвердила, что внутриопухольный уровень VEGF вносит дополнительный вклад в так называемый Ноттингемский прогностический индекс, используемый для формирования групп повышенного риска среди больных ранними стадиями РМЖ.

В большом ретроспективном исследовании [18] иммуноферментным методом измерили концентрацию VEGF в сохраненных экстрактах у 845 больных распространенным РМЖ с развившимся рецидивом заболевания, 618 из которых получали адъювантную послеоперационную гормонотерапию тамоксифе-

ном и 227 — послеоперационную химиотерапию. Содержание VEGF в опухолях больных, у которых рецидив возник в течение первого года наблюдения, оказалось достоверно выше, чем у пациентов с более длительным безрецидивным периодом. Высокий уровень VEGF, по данным одно- и многофакторного анализа, оказался независимым показателем низкой чувствительности как к тамоксифену, так и к химиотерапии.

В целом восемь независимых групп исследователей продемонстрировали, что высокий уровень VEGF — независимый фактор неблагоприятного прогноза РМЖ на ранних стадиях и/или его низкой чувствительности к традиционным видам гормоно- или химиотерапии при распространенном процессе. В связи с этим предлагалось рассмотреть возможность включать в схемы адъювантной терапии больных с высокой внутриопухольной концентрацией VEGF различных антиангиогенных препаратов. Единые методические подходы и критерии, определяющие больных с высоким уровнем VEGF, пока не разработаны, и для их создания потребуются дальнейшие кооперированные исследования.

Параллельно с исследованием клинического значения тканевого уровня VEGF при РМЖ изучается и вопрос о том, отражается ли повышенная экспрессия VEGF в опухоли на уровне этого белка в сыворотке/плазме крови и является ли концентрация циркулирующего VEGF адекватной характеристикой его содержания и активности ангиогенеза в опухоли. Первые данные о повышении уровня VEGF в крови онкологических больных были опубликованы еще в конце 1990-х гг. [15, 26, 39, 48]. Однако наиболее интересны сравнительные исследования, в которых одновременно определяли содержание/экспрессию VEGF в опухолевой ткани и сыворотке крови. G. Callagy et al [13], определявшие тканевую экспрессию VEGF иммуногистохимическим методом, пришли к выводу, что именно этот показатель, но не сывороточная концентрация VEGF, коррелирует с плотностью микрососудов и стадией РМЖ и является поэтому более надежным прогностическим фактором, чем уровень VEGF в сыворотке крови. Они не обнаружили также взаимосвязи уровня VEGF в сыворотке и его экспрессии в опухоли. J.Adams et al [7] определяли содержание VEGF в сыворотке и плазме

крови и экспрессию VEGF в опухоли (иммуногистохимически) у 201 больной локализованным и распространенным РМЖ, доброкачественными опухолями молочной железы и здоровых женщин. При метастатическом РМЖ отмечено достоверное повышение уровня VEGF как в плазме, так и в сыворотке крови по сравнению с нормой. Содержание VEGF в плазме крови при метастатическом РМЖ было достоверно повышено также по сравнению с больными доброкачественными опухолями и локализованным РМЖ. При локализованном РМЖ наблюдалось только увеличение уровня VEGF в плазме крови по сравнению с контролем. Парадоксально, но наиболее высокие уровни VEGF в сыворотке и плазме крови были обнаружены у больных РМЖ, находящихся в ремиссии на фоне лечения тамоксифеном. Уровень циркулирующего VEGF, по данным этих авторов, не коррелировал ни с одним из известных клинико-патологических факторов, включая микрососудистую плотность и тканевую экспрессию VEGF.

В сравнительном иммуноферментном исследовании [1] мы определили уровни свободного и общего VEGF в опухолях, гистологически неизменной молочной железе, а также в сыворотке крови, полученной до и после оперативного вмешательства, у 109 больных РМЖ. Было показано, что в крови 81% больных РМЖ повышен уровень свободного VEGF по сравнению со здоровыми донорами, тогда как уровень общего (свободного и связанного с различными белками) VEGF практически не отличается от нормы. Следовательно, сывороточный уровень свободного, но не общего VEGF отражает активацию процессов неоангиогенеза в ткани рака молочной железы. В пользу этого предпо-

ложения свидетельствовало и наличие слабой, но достоверной положительной корреляционной взаимосвязи между уровнями свободного VEGF в сыворотке крови и цитозолях опухолей, которой не наблюдалось для общего VEGF. Тем не менее, при повторном исследовании сывороточного уровня VEGF через 2–14 дней после удаления первичной опухоли этот показатель снижался лишь у половины больных, а у части больных он даже существенно увеличивался (возможно, за счет активации процессов ангиогенеза при заживлении послеоперационной раны). Кроме того, мы не обнаружили ожидаемой положительной взаимосвязи между концентрацией VEGF в сыворотке крови и общей клинической стадией РМЖ или отдельными показателями распространенности процесса по системе TNM [2]. И более того, наблюдалось парадоксальное достоверное увеличение сывороточного показателя VEGF при первой стадии заболевания.

Таким образом, изучение содержания VEGF в сыворотке крови больных РМЖ показало, что только уровень свободного фактора роста в большей или меньшей степени отражает его продукцию в опухолевой ткани, но даже этот показатель, по-видимому, складывается из различных составляющих и не в полной мере характеризует активность неоангиогенеза в ткани РМЖ. И в целом, по нашим данным и данным литературы, до настоящего времени возможность использовать показатели содержания VEGF в крови (как в сыворотке, так и в плазме) в качестве адекватной замены тканевой экспрессии этого белка при оценке активности ангиогенеза в РМЖ и прогнозировании исхода заболевания и эффективности терапии не доказана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герштейн Е.С., Щербаков А.М., Алиева С.К. и др. Фактор роста эндотелия сосудов в опухолях и сыворотке крови больных раком молочной железы // Бюлл. Экспер. Биол. Мед. — 2003. — Т. 135(1). — С. 85–88.
2. Герштейн Е.С., Щербаков А.М., Алиева С.К. и др. Фактор роста эндотелия сосудов в опухолях и сыворотке крови больных раком молочной железы: связь с клинико-морфологическими факторами // Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН — 2005. — № 1–2. — С. 26–30.
3. Ким Е.А., Герштейн Е.С., Высоцкая И.В., Кушлинский Н.Е. Экспрессия VEGF и VEGFR2 в опухолях в процессе неoadьювантного лечения больных раком молочной железы // Бюлл. Экспер. Биол. Мед. — 2008. — Т. 145 (2). — С. 206–209.
4. Ким Е.А., Герштейн Е.С., Щербаков А.М. и др. Влияние неoadьювантной терапии на уровни VEGF и VEGFR-2 в опухолях и сыворотке крови больных раком молочной железы // Вопросы онкологии. — 2008. — Том 54 (3). — С. 287–293.
5. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С. Роль фактора роста эндотелия сосудов при раке молочной железы // Бюлл. Экспер. Биол. Мед. — 2002. — Т. 133 (6). — С. 604–612.

6. Щербаков А.М., Герштейн Е.С., Анурова О.А., Кушлинский Н.Е. Фактор роста эндотелия сосудов и его рецепторы первого и второго типа при раке молочной железы // Вопросы онкологии. — 2005. — Т. 51 (3). — С. 317–321.
7. Adams J., Carder P.J., Downey S. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen // *Cancer Res.* — 2000. — Vol. 60 (11). — P. 2898–2905.
8. Aesoy R., Sanchez B.C., Norum J.H. et al. An autocrine VEGF/VEGFR2 and p38 signaling loop confers resistance to 4-hydroxytamoxifen in MCF-7 breast cancer cells // *Mol. Cancer Res.* — 2008. — Vol. 6 (10). — P. 1630–1638.
9. Anan K., Morisaki T., Katano M. et al. Vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor are potential angiogenic and metastatic factors in human breast cancer // *Surgery.* — 1996. — Vol. 119 (3). — P. 333–339.
10. Anan K., Morisaki T., Katano M. et al. Assessment of c-erbB2 and vascular endothelial growth factor mRNA expression in fine-needle aspirates from early breast carcinomas: pre-operative determination of malignant potential // *Eur. J. Surg. Oncol.* — 1998. — Vol. 24 (1). — P. 28–33.
11. Blancher C., Moore J.W., Robertson N., Harris A.L. Effects of ras and von Hippel-Lindau (VHL) gene mutations on hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha, HIF-2alpha, and vascular endothelial growth factor expression and their regulation by the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway // *Cancer Res.* — 2001. — Vol. 61 (19). — P. 7349–7355.
12. Brown L.F., Guidi A.J., Schnitt S.J. et al. Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast // *Clin. Cancer Res.* — 1999. — Vol. 5 (5). — P. 1041–1056.
13. Callagy G., Dimitriadis E., Harmey J. et al. Immunohistochemical measurement of tumor vascular endothelial growth factor in breast cancer. A more reliable predictor of tumor stage than microvessel density or serum vascular endothelial growth factor // *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* — 2000. — Vol. 8 (2). — P. 104–109.
14. Coradini D., Boracchi P., Daidone M.G. et al. Contribution of vascular endothelial growth factor to the Nottingham prognostic index in node-negative breast cancer // *Br. J. Cancer.* — 2001. — Vol. 85 (6). — P. 795–797.
15. Dirix L.Y., Vermeulen P.B., Pawinski A. et al. Elevated levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera of cancer patients // *Br. J. Cancer.* — 1997. — Vol. 76 (2). — P. 238–243.
16. Eppenberger U., Kueng W., Schlaeppli J.M. et al. Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients // *J. Clin. Oncol.* — 1998. — Vol. 16 (9). — P. 3129–3136.
17. Ferrara N., Heinsohn H., Walder C.E. et al. The regulation of blood vessel growth by vascular endothelial growth factor // *Ann. N Y Acad. Sci.* — 1995. — Vol. 752. — P. 246–256.
18. Foekens J.A., Peters H.A., Grebenchtchikov N. et al. High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer // *Cancer Res.* — 2001. — Vol. 61 (14). — P. 5407–5414.
19. Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer // *Oncologist.* — 2000. — Vol. 5 (Suppl 1). — P. 37–44.
20. Gasparini G. Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* — 2001. — Vol. 37 (2). — P. 97–114.
21. Gasparini G., Toi M., Miceli R. et al. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in patients with node-positive breast cancer treated with either adjuvant chemotherapy or hormone therapy // *Cancer J. Sci. Am.* — 1999. — Vol. 5 (2). — P. 101–111.
22. Greb R.R., Maier I., Wallwiener D., Kiesel L. Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) mRNA expression levels decrease after menopause in normal breast tissue but not in breast cancer lesions // *Br. J. Cancer.* — 1999. — Vol. 81 (2). — P. 225–231.
23. Guidi A.J., Schnitt S.J., Fischer L. et al. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in patients with ductal carcinoma in situ of the breast // *Cancer.* — 1997. — Vol. 80 (10). — P. 1945–1953.
24. Hyder S.M., Nawaz Z., Chiappetta C., Stancel G.M. Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor // *Cancer Res.* — 2000. — Vol. 60 (12). — P. 3183–3190.
25. Hyder S.M., Stancel G.M. Regulation of VEGF in the reproductive tract by sex-steroid hormones // *Histol. Histopathol.* — 2000. — Vol. 15 (1). — P. 325–334.
26. Kraft A., Weindel K., Ochs A. et al. Vascular endothelial growth factor in the sera and effusions of patients with malignant and nonmalignant disease // *Cancer.* — 1999. — Vol. 85 (1). — P. 178–187.
27. Kranz A., Mattfeldt T., Waltenberger J. Molecular mediators of tumor angiogenesis: enhanced expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor KDR in primary breast cancer // *Int. J. Cancer.* — 1999. — Vol. 84 (3). — P. 293–298.
28. Laughner E., Taghavi P., Chiles K. et al. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression // *Mol. Cell Biol.* — 2001. — Vol. 21 (12). — P. 3995–4004.

29. Linderholm B., Andersson J., Lindh B. et al. Overexpression of c-erbB-2 is related to a higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and constitutes an independent prognostic factor in primary node-positive breast cancer after adjuvant systemic treatment // *Eur. J. Cancer.* — 2004. — Vol. 40 (1). — P. 33–42.
30. Linderholm B., Bergqvist J., Hellborg H. et al. Shorter survival-times following adjuvant endocrine therapy in oestrogen- and progesterone-receptor positive breast cancer overexpressing HER2 and/or with an increased expression of vascular endothelial growth factor // *Med. Oncol.* — 2009. — Vol. 26 (4). — P. 480–490.
31. Linderholm B., Tavelin B., Grankvist K., Henriksson R. Does vascular endothelial growth factor (VEGF) predict local relapse and survival in radiotherapy-treated node-negative breast cancer? // *Br. J. Cancer.* — 1999. — Vol. 81 (4). — P. 727–732.
32. Linderholm B.K., Gruvberger-Saal S., Ferno M. et al. Vascular endothelial growth factor is a strong predictor of early distant recurrences in a prospective study of premenopausal women with lymph-node negative breast cancer // *Breast.* — 2008. — Vol. 17 (5). — P. 484–491.
33. Linderholm B.K., Hellborg H., Johansson U. et al. Significantly higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and shorter survival times for patients with primary operable triple-negative breast cancer // *Ann. Oncol.* — 2009. — Vol. 20 (10). — P. 1639–1646.
34. Linderholm B.K., Hellborg H., Johansson U. et al. Vascular endothelial growth factor receptor 2 and down-stream p38 mitogen-activated protein kinase are possible candidate markers of intrinsic resistance to adjuvant endocrine treatment in steroid receptor positive breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2011. — Vol. 125 (2). — P. 457–465.
35. Locopo N., Fanelli M., Gasparini G. Clinical significance of angiogenic factors in breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* — 1998. — Vol. 52 (1–3). — P. 159–173.
36. Obermair A., Kucera E., Mayerhofer K. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in human breast cancer: correlation with disease-free survival // *Int. J. Cancer.* — 1997. — Vol. 74 (4). — P. 455–458.
37. Relf M., LeJeune S., Scott P.A. et al. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis // *Cancer Res.* — 1997. — Vol. 57 (5). — P. 963–969.
38. Ryden L., Linderholm B., Nielsen N.H. et al. Tumor specific VEGF-A and VEGFR2/KDR protein are co-expressed in breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.*—2003. — Vol. 82 (3). — P. 147–154.
39. Salven P., Perhoniemi V., Tykka H. et al. Serum VEGF levels in women with a benign breast tumor or breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.* — 1999. — Vol. 53 (2). — P. 161–166.
40. Sato Y. Transcription factor ETS-1 as a molecular target for angiogenesis inhibition // *Hum. Cell.* — 1998. — Vol. 11 (4). — P. 207–214.
41. Scott P.A., Smith K., Poulsom R. et al. Differential expression of vascular endothelial growth factor mRNA vs protein isoform expression in human breast cancer and relationship to eIF-4E // *Br. J. Cancer.* — 1998. — Vol. 77 (12). — P. 2120–2128.
42. Speirs V., Atkin S.L. Production of VEGF and expression of the VEGF receptors Flt-1 and KDR in primary cultures of epithelial and stromal cells derived from breast tumours // *Br. J. Cancer.* — 1999. — Vol. 80 (5–6). — P. 898–903.
43. Toi M., Hoshina S., Takayanagi T., Tominaga T. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer // *Jpn. J. Cancer Res.* — 1994. — Vol. 85 (10). — P. 1045–1049.
44. Toi M., Inada K., Suzuki H., Tominaga T. Tumor angiogenesis in breast cancer: its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression // *Breast Cancer Res. Treat.* — 1995. — Vol. 36 (2). — P. 193–204.
45. Toi M., Kondo S., Suzuki H. et al. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer // *Cancer.* — 1996. — Vol. 77 (6). — P. 1101–1106.
46. Vandebunder B., Wernert N., Stehelin D. Does oncogene c-ets 1 participate in the regulation of tumor angiogenesis? // *Bull. Cancer.* — 1993. — Vol. 80 (1). — P. 38–49.
47. Xie B., Tam N.N., Tsao S.W., Wong Y.C. Co-expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (flk-1 and flt-1) in hormone-induced mammary cancer in the Noble rat // *Br. J. Cancer.* — 1999. — Vol. 81 (8). — P. 1335–1343.
48. Yamamoto Y., Toi M., Kondo S. et al. Concentrations of vascular endothelial growth factor in the sera of normal controls and cancer patients // *Clin. Cancer Res.* — 1996. — Vol. 2 (5). — P. 821–826.
49. Yen L., You X.L., Al Moustafa A.E. et al. Heregulin selectively upregulates vascular endothelial growth factor secretion in cancer cells and stimulates angiogenesis // *Oncogene.* — 2000. — Vol. 19 (31). — P. 3460–3469.
50. Yoshiji H., Gomez D.E., Shibuya M., Thorgeirsson U.P. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer // *Cancer Res.* — 1996. — Vol. 56 (9). — P. 2013–2016.