

# Роль рецепторов VEGF – А165 в ангиогенезе

И.В. Арутюнян<sup>1,2</sup>, Е.Ю. Кананыхина<sup>2</sup>, А.В. Макаров<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова МЗ РФ, Москва

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт морфологии человека РАМН, Москва

## Role of VEGF–A165 receptors in angiogenesis

I.V. Arutyunyan<sup>1,2</sup>, E.Y. Kananykhina<sup>2</sup>, A.V. Makarov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology MH of RF, Moscow

<sup>2</sup> Research Institute of Human Morphology of the RAMS, Moscow

Представлен обзор современных литературных данных о различной роли двух рецепторов сосудистого эндотелиального фактора роста-А165 (VEGF-А165) в регуляции ангиогенеза. VEGFR2 является основным эффекторным рецептором и запускает внутриклеточные каскады, обеспечивающие выживаемость, пролиферацию и миграцию эндотелиоцитов, привлечение прогениторных клеток, формирование и созревание новых кровеносных сосудов. VEGFR1 же является основным регулятором активности VEGF-А165, предотвращая чрезмерный ангиогенный ответ за счет механизма отрицательной обратной связи. Проанализированы данные о вариативности количества и соотношения рецепторов VEGFR1 и VEGFR2 на поверхности различных клеточных типов, обеспечивающих тонкую регуляцию действия лиганда.

**Ключевые слова:** сосудистый эндотелиальный фактор роста, VEGFR1, VEGFR2, эндотелиальные клетки, ангиогенез.

Ангиогенез является сложным многоступенчатым процессом, в который одновременно вовлечены многие типы клеток, отвечающие на действие десятков индукторов и ингибиторов ангиогенеза [1, 2]. Стимуляция ангиогенеза для терапии ишемических состояний или подавление при лечении новообразований невозможно без понимания механизмов его регулирования. Взаимодействие клеточных технологий и современных методов экспериментальной молекулярной биологии открывает перед исследователями возможность поиска новых мишеней для индукции или ингибирования ангиогенеза.

Одним из наиболее перспективных направлений для про- или анти-ангиогенной терапии является введение в организм сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) или его ингибиторов в виде рекомбинантных белков, генетических конструкций или генетически модифицированных клеток. В то же время клинические исследования показали, что терапевтический эффект у отдельных пациентов значительно варьирует, что может свидетельствовать об изначальной гетерогенности популяции по некоторым факторам ангиогенеза, тесно связанным с VEGF [3]. Для увеличения эффективности VEGF-ориентированной терапии необходимо учитывать эндогенные механизмы регуляции ангиогенеза: наличие положительных или отрицательных обратных связей, конкурентных ингибиторов и т.п. Наиболее очевидным с этой точки зрения является исследование взаимодействий в системе VEGF-VEGFR (рецеп-

We present an overview of current literature data on the different roles of key proangiogenic factor VEGF-A-165' receptors in angiogenesis regulation. VEGFR2 is the major effector receptor and runs intracellular cascades that provide survival, proliferation and migration of endothelial cells, the involvement of progenitor cells, the formation and maturation of new blood vessels. VEGFR1 contrary is the main regulator of the activity of VEGF-A-165, preventing excessive angiogenic response through the mechanism of negative feedback. The article also presents data on the variability of number and ratio of VEGFR1 and VEGFR2 on the surface of different cell types, providing the fine regulation of the VEGF-A-165 pathway.

**Key words:** vascular endothelial growth factor, VEGFR1, VEGFR2, endothelial cells, angiogenesis.

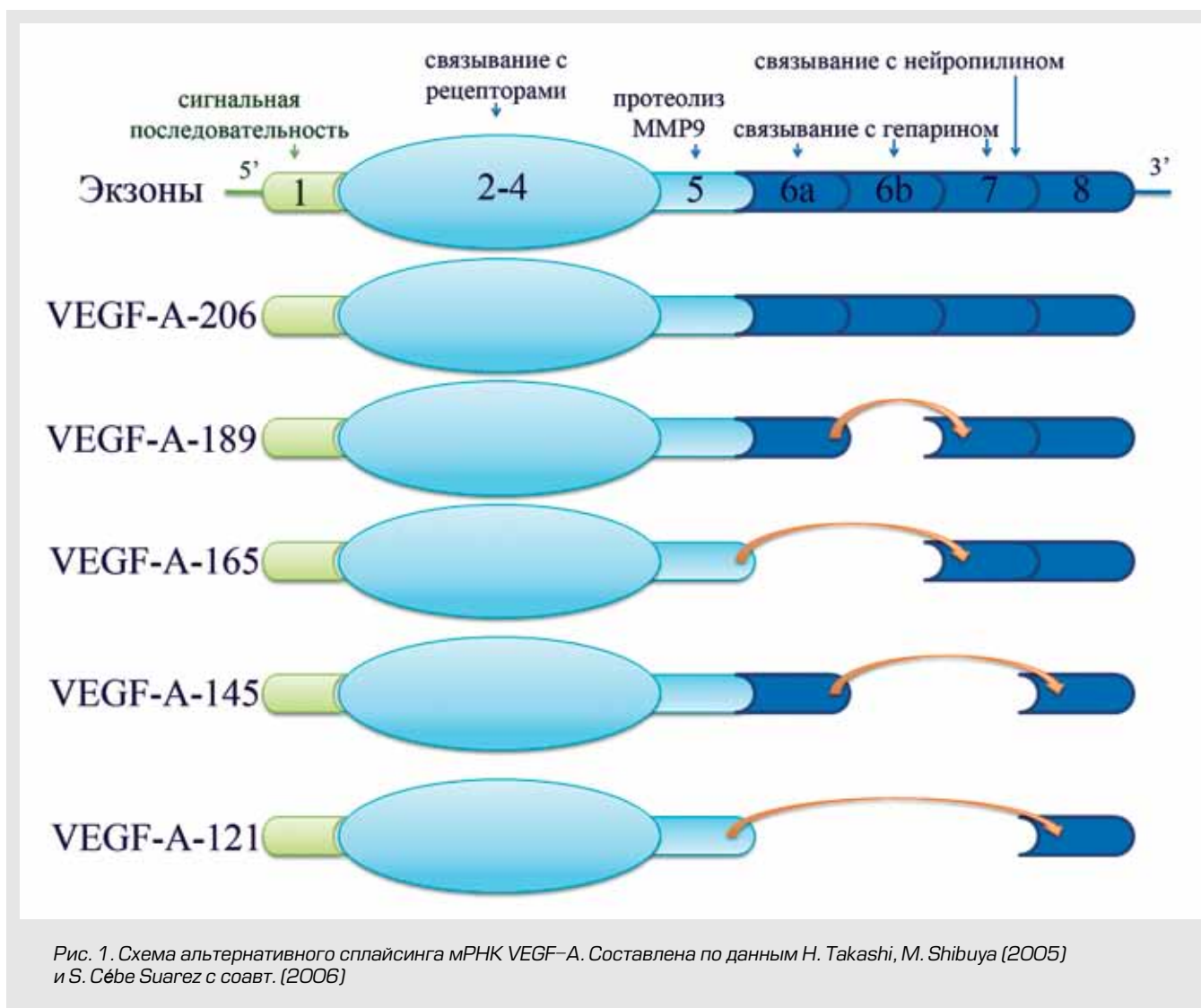
тор VEGF) в качестве первого рубежа регулирования передачи сигнала VEGF.

## Семейство белков VEGF

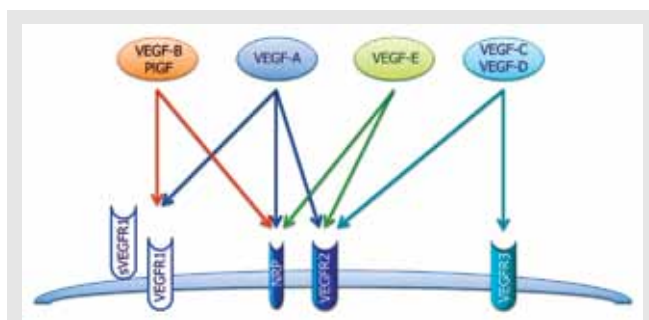
VEGF является ключевым фактором ангиогенеза как в пренатальном, так и в постнатальном периоде [4]. Впервые фактор, избирательно стимулирующий пролиферацию эндотелиоцитов, был выделен в лаборатории J. Folkman в 1971 г. [5]. За прошедшие 40 лет ведущая роль белков семейства VEGF в физиологическом и патологическом ангиогенезе была подтверждена многочисленными исследованиями. VEGF синтезируют многие типы клеток: скелетные миобласты, эндотелиальные клетки, циркулирующие в периферической крови Т-клетки [6] и даже адипоциты [7]. В условиях гипоксии транскрипционный фактор HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) обеспечивает 30-кратное увеличение синтеза VEGF в течение нескольких минут [8]. При этом возрастает не только концентрация VEGF в кровотоке, но и увеличивается стабильность мРНК и время полужизни самого белка [9, 10].

Семейство VEGF состоит из нескольких подгрупп и включает в себя как минимум 9 изоформ VEGF-A, 4 изоформы PlGF (placental growth factor), 2 изоформы VEGF-B и другие белки. Множество вариантов одного белка обеспечивается за счет альтернативного сплайсинга в С-концевой области (гепарин-связывающем домене), обеспечивающей связь белка с поверхностью клетки (рис. 1).

e-mail: labrosta@yandex.ru



Члены семейства VEGF имеют разную степень аффинности к группе рецепторов, в которую входят рецепторы VEGFR1 (а также его растворимая форма sVEGFR1), VEGFR2, VEGFR3 и корецепторы NRP1 и NRP2 (нейропилины 1 и 2) [11] (рис. 2).



Наибольшее значение для ангиогенеза имеет группа факторов VEGF-A, иначе называемая VPF (vascular permeability factor), а точнее – изоформа VEGF-A165. Данный белок (Мг около 46 kDa) имеет умеренное сродство к гепарину, поэтому около 50% его связано с поверхностью клетки и 50% способно диффундировать [12]. Это отличает VEGF-165 от других изоформ: VEGF-121 является полностью секретируемым белком, а VEGF-183/189/206 прочно связаны с клеточной мембраной и имеют низкую биологическую активность [11]. При этом соотношение VEGF-165 к VEGF-121 в клетке при физиологических условиях составляет 92 к 8% [10].

VEGF-A способен связываться с рецепторами VEGFR1 и VEGFR2, при этом только изоформа VEGF-A165 имеет сродство к нейропилину NRP1, который значительно усиливает сигнал при стабилизации комплекса NRP1-VEGF-VEGFR2 [13, 14].

#### Рецептор VEGFR1

Наиболее прочно VEGF-A-165 связывается с рецептором VEGFR1 (иначе называемым Flt-1): аффинность к нему, по крайней мере, в 10 раз больше, чем ко второму рецептору – VEGFR2. Было показано, что нокаутные по гену *flt-1* мыши гибнут на 9 сут.

внутриутробного развития, но не от отсутствия васкулогенеза, а от дезорганизации и чрезмерного роста сосудов [15]. Это позволило выдвинуть предположение о том, что в раннем эмбриогенезе VEGFR1 регулирует ангиогенез, связывая излишек VEGF [13].

В экспериментах по исследованию функциональной активности VEGFR1 в постнатальном периоде было продемонстрировано, что избирательная активация только этого рецептора не приводит к пролиферации первичной культуры эндотелиальных клеток [16]. Выключение этого рецептора не влияет на VEGF-A-индуцированную пролиферацию клеток линии HUVEC (эндотелиальные клетки пупочной вены человека), но подавляет реорганизацию актинового цитоскелета, снижая тем самым способность клеток к миграции [17]. В эндотелиальных клетках и макрофагах активация VEGFR1 запускает внутриклеточный каскад реакций с участием p38 MAP (mitogen-activated protein)-киназ, итогом которого является не только перестройка цитоскелета, но и запуск синтеза матриксных металлопротеиназ (MMP), в частности – MMP-9 [18].

MMP-9 (другие названия: желатиназа В, коллагеназа IV типа) относится к группе Zn-зависимых эндопептидаз, способных к деградации коллагеновых и эластиновых волокон внеклеточного матрикса. Экспорт везикул с неактивной формой MMP-9 идет с помощью кинезин-зависимого транспорта по системе стабилизированных микротрубочек, т.е. реорганизация цитоскелета в активированных клетках затрагивает не только актиновый компонент [19]. Вне клетки 92 kDa предшественник MMP-9 расщепляется протеазами (в частности плазмином) до образования 85 kDa активной формы, способной к разрушению базальной мембраны сосудов [20] и плотных контактов между эндотелиоцитами [21]. Локальное растворение базальной мембраны обеспечивает возможность миграции макрофагов, эндотелиоцитов и их предшественников в ткани [22].

Еще одним свойством MMP-9 является ее способность высвобождать связанные с внеклеточным матриксом изоформы VEGF за счет внутримолекулярного протеолиза, в процессе которого рецептор-связывающий домен отделяется от С-концевого участка, заякоривающего молекулу в матриксе (гепарин-связывающего домена). В результате получают фрагменты VEGF-113, еще более короткие, чем полностью секретируемый VEGF-121, и способные связываться с VEGFR2. Таким образом, MMP-9 вовлекает в ангиогенез изоформы фактора VEGF, прежде выключенные из данного процесса из-за их биологической недоступности [23]. Однако появление свободных рецептор-связывающих участков VEGF не стимулирует ангиогенез, как это могло бы показаться на первый взгляд. Такие фрагменты молекул являются конкурентными ингибиторами VEGF-165, т.к. связываются со свободными рецепторами VEGFR2, но не «узнаются» корецептором NRP-1, что значительно уменьшает киназную активность основного рецептора [24, 25].

MMP-9 способна к протеолитической активности не только в отношении VEGF, но и ряда других молекул, в том числе плазминогена. Одним из продуктов его расщепления является ангиостатин, ингибирующий пролиферацию эндотелиоцитов и формирование ими тубулярных структур *in vitro* [26] и *in vivo* [27].

Таким образом, существует как минимум два механизма отрицательной обратной связи за счет VEGFR1-опосредованного высвобождения MMP-9 конкурентных изоформ VEGF и ангиостатина. В то же время существуют отдельные данные о наличии положительной обратной связи между MMP-9 и уровнем VEGF. Так, при добавлении экзогенной MMP-9 в культуру пигментного эпителия сетчатки человека дозозависимо увеличивается уровень транскрипции и трансляции VEGF-165 [28]. Представляемая схема VEGFR1-сигнального пути представлена на рис. 3.

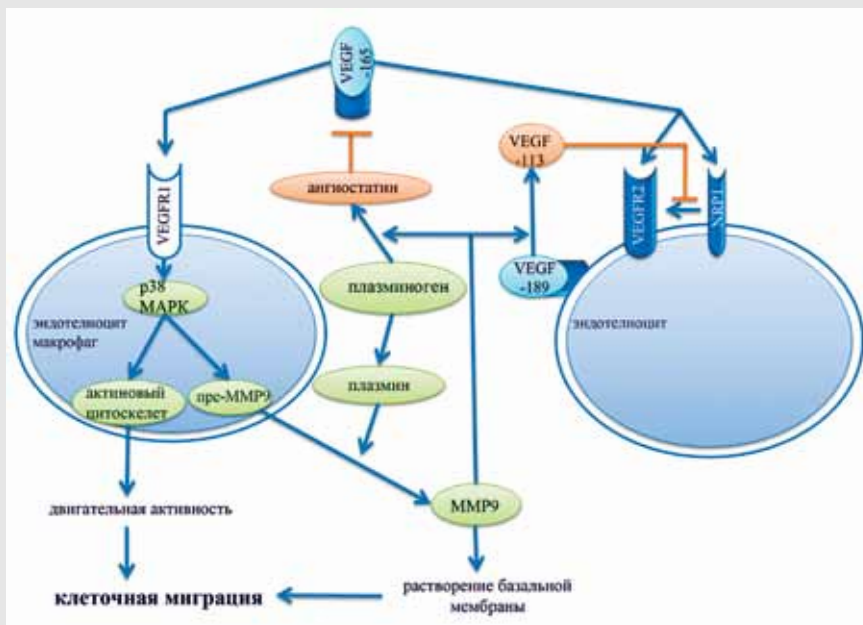


Рис. 3. Схема VEGFR1-сигнального пути: p38 MAPK – киназы митоген-активируемых белков p38; пре-MMP9 – неактивная форма матриксной металлопротеиназы 9 типа; MMP9 – активная форма матриксной металлопротеиназы 9 типа; NRP1 – корецептор нейропилин-1

### Рецептор VEGFR2

VEGFR2 (другие названия: Flk-1 или, в клетках человека, KDR) является основным медиатором ангиогенных, митогенных и антиапоптотических свойств VEGF-A. Нокаутные по гену *flk-1* мыши гибнут на 8 сут. внутриутробного развития из-за отсутствия формирования кровеносных сосудов и чрезвычайно низкого гемопоэза [29]. Антитела против VEGFR2 полностью ингибируют VEGF-индуцированную пролиферацию клеточной культуры HUVEC [17].

Киназная активность VEGFR2 значительно выше, чем у VEGFR1, при этом механизмы активации многих белков остаются до конца невыясненными. Большая часть данных о внутриклеточных каскадах была получена методом ингибирования отдельных белков с помощью высокоспецифичных антител на культурах эндотелиальных клеток *in vitro* или нокаутных мышах *in vivo*.

Было продемонстрировано, что связывание VEGF-A-165 с VEGFR2 активирует фосфолипаза C-зависимый путь фосфорилирования ERK1/2 (extracellular-signal-regulated kinases 1/2), которые в свою очередь действуют через циклин D1 и запускают синтез ДНК в эндотелиоцитах (G1/S переход фаз клеточного цикла) [17].

Как и в случае VEGFR1-опосредованного сигнала активация VEGFR2 приводит к запуску p38 MAP-киназа, что обеспечивает реорганизацию актинового цитоскелета, однако в этот процесс вовлечены и PI3K (phosphatidylinositol 3-kinases) путь активации. Одновременно происходит фосфорилирование FAK (focal adhesion kinase) и паксиллина, а также сборка винкулина в области фокальных бляшек. Все вместе приводит к появлению фокальных бляшек в области новообразованных филоподий, что обеспечивает клеточную подвижность [17].

PI3K-зависимым является и фосфорилирование Akt (протеинкиназы B), запускающей синтез антиапоптотического белка Bcl-2, что обеспечивает выживание эндотелиоцитов в условиях гипоксии [30].

Другой функцией киназы Akt является участие в активации эндотелиальной NO-синтазы (eNOs), имеющей главенствующее значение среди других представителей семейства NO-синтаз в процессе ангиогенеза [31]. eNOs конститутивно экспрессируется в эндотелиоцитах, однако находится в неактивной форме и связана с поверхностной мембраной белком кавеолином-1. Данный белок играет важную роль в формировании кавеол — вогнутых участков мембраны, особенно хорошо выраженных на поверхности эндотелиоцитов. Экспериментальные исследования показали, что кавеолин имеет достаточно большое значение в процессе ангиогенеза. Дефицитные по кавеолину мыши продемонстрировали значительно худшие результаты при восстановлении кровоснабжения ишемизированных конечностей по сравнению с контрольными животными, при этом часть конечностей была потеряна. Первичная культура эндотелиоцитов, выделенных из стенки аорты дефектных по кавеолину мышей, при стимуляции VEGF показала сниженные продукцию NO и формирование тубулярных структур *in vitro* [32].

Объяснением этому является факт солокализации рецептора VEGFR2 и eNOs на поверхности мембраны внутри кавеол, без которой VEGF-индуцированная активация eNOs является неполноценной [32].

Кавеолин связывает оба этих белка с мембраной и поддерживает их в неактивном состоянии, однако при воздействии VEGF данный комплекс достаточно быстро диссоциирует. Удаление VEGFR2 из кавеол за счет сглаживания мембраны приводит к ингибированию VEGF-индуцированной активации ERK1/2 и миграции эндотелиоцитов, что позволило сделать вывод о значимости кавеолин-зависимой солокализации VEGFR2 и eNO-синтазы [33].

Переход eNOs из связанной формы в активную, способную продуцировать NO (за счет перевода L-аргинина в L-цитруллин), является довольно сложным процессом, инициируемым VEGF (рис. 4). VEGF связывается с VEGFR2 и запускает фосфолипаза C-зависимый сигнальный путь, который приводит к высвобождению ионов кальция из эндоплазматического ретикулума и последующей активацией  $Ca^{2+}$ -связывающего белка кальмодулина. Кальмодулин связывается с eNO-синтазой и открепляет ее от кавеолина, перенося неактивный белок в цитоплазму, где к комплексу присоединяется молекулярный шаперон Hsp90. Киназа Akt фосфорилирует eNOs, переводя ее в активное состояние [34, 35].

Выключение гена *nos3* приводит к повреждению сосудистой системы: у дефицитных по eNOs мышей наблюдали гипертензию, усиленную пролиферацию гладкомышечных клеток в ответ на повреждение сосуда, повышение агрегации тромбоцитов и лейкоцитов. Эти исследования показали, что eNOs и продукт ее активности NO (оксид азота) играют важную роль в запуске пролиферации эндотелиоцитов, их миграции и проницаемости сосудов [36, 34]. Дефицит eNO-синтазы приводит также к значительному уменьшению общего числа предшественников эндотелиоцитов в костном мозге, периферической крови и селезенке [37]. При моделировании ишемии на eNOs<sup>-/-</sup> мышах было значительно снижено перераспределение кровотока по предсуществующим коллатералям, а ангиогенный эффект вводимых цитокинов VEGF и SDF-1 нивелирован [38].

В 1998 г. Нобелевская премия по медицине была присуждена исследователям R. Furchgott, L. Ignarro и F. Murad за открытие роли оксида азота как сигнальной молекулы в регуляции сердечно-сосудистой системы, в частности за открытие активации им гуанилатциклазы. Этот результат позволил понять механизмы гипотензивного, спазмолитического, а также противотромбозного действия различных нитрозо- и нитросоединений, в частности нитроглицерина, способных продуцировать в организме животных и человека оксид азота [39].

Оксид азота является одновременно транзиторной аутокринной и паракринной сигнальной молекулой благодаря наличию растворимой и связанной с мембраной форм рецепторов NO, обладающих гуанилатциклазной активностью. Гуанилатциклаза конвертирует GTP в cGMP, запускающий PKG (protein kinase G)-зависимый каскад реакций, включающий ERK-сигнальный путь пролиферации эндотелиоцитов. PKG также обеспечивает ингибирование киназы легких цепей миозина в мышечных клетках стенки сосудов, что приводит к снижению сшивков молекул миозина, расслаблению гладкомышечных клеток и вазодилатации [40, 41]. Последнее свойство объясняет действие оксида азота в качестве EDRF (endothelium-derived relaxing factor), того самого «неуловимого» короткоживущего фактора, вызывающего

расслабление сосудов и открытого еще в 1980 году в лаборатории R. Furchgott [42].

Помимо расслабления гладкомышечных клеток оксид азота ингибирует пролиферацию гладкомышечных клеток, агрегацию тромбоцитов и адгезию лейкоцитов к эндотелию [40].

Таким образом, VEGFR2-рецептор запускает сложный каскад внутриклеточных реакций, обеспечивающих миграцию и пролиферацию эндотелиоцитов, их устойчивость к апоптотическим факторам, а также проницаемость стенки сосудов (рис. 5).

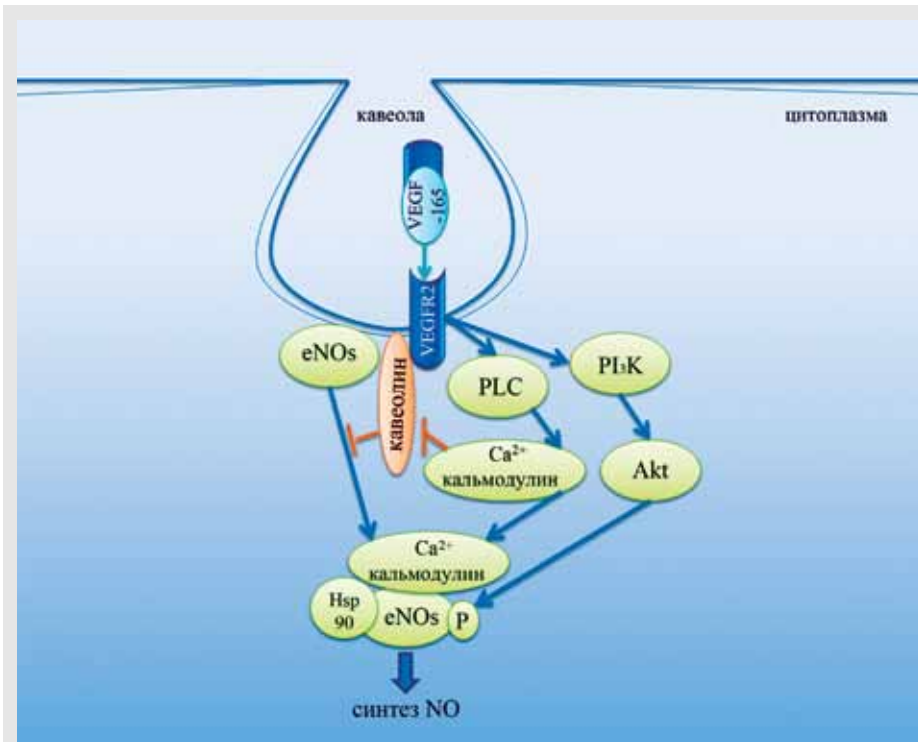


Рис. 4.  
Схема активации эндотелиальной NO-синтазы:  
eNOs – эндотелиальная NO-синтаза;  
PLC – фосфолипаза С;  
PI3K – фосфоинозитид-3-киназа;  
Akt – протеинкиназа В;  
Hsp90 – белок теплового шока 90кДа;  
P – остаток фосфорной кислоты

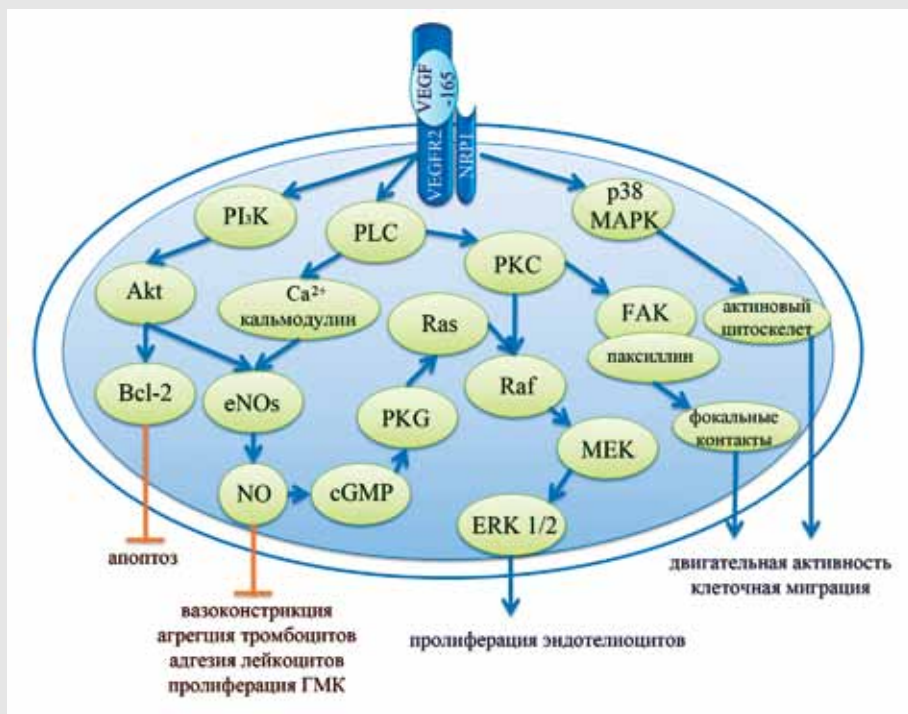


Рис. 5.  
Схема VEGFR2-сигнального пути:  
PI3K – фосфоинозитид-3-киназа;  
Akt – протеинкиназа В;  
Bcl-2 – белок-регулятор апоптоза;  
PLC – фосфолипаза С;  
eNOs – эндотелиальная NO-синтаза;  
NO – оксид азота;  
cGMP – циклический гуанозинмонофосфат;  
PKG – протеинкиназа G;  
Ras – сигнальный белок; малая ГТФ-аза;  
PKC – протеинкиназа С;  
Raf – протоонкоген;  
MEK – киназа митоген-активируемых киназ;  
ERK 1/2 – киназы, активируемые внеклеточными сигналами типов 1 и 2;  
p38 MAPK – киназы митоген-активируемых белков p38;  
FAK – киназа фокальной адгезии

### Уровень экспрессии рецепторов VEGFR1 и VEGFR2 на поверхности клеток

Рецептор VEGFR1 экспрессируется на поверхности эндотелиальных клеток кровеносных сосудов, гемопоэтических стволовых клеток [43] и клеток моноцитарно-макрофагального ряда [44].

Рецептор VEGFR2 экспрессируется не только эндотелиоцитами, но и эндотелиальными прогениторными клетками. Низкий уровень экспрессии VEGFR2

обнаружен и в нейрональных клетках, остеобластах, клетках поджелудочной железы и мегакариоцитах, однако биологическое значение присутствия этого белка на неэндотелиальных клетках остается невыясненным [13].

Недавно были получены данные о различном уровне экспрессии рецепторов VEGFR1 и VEGFR2 в зависимости от клеточного типа и присутствия VEGF-A165 [45, 46] (табл.).

### Уровень экспрессии рецепторов VEGFR1 и VEGFR2 различными клетками

Тип клеток	VEGFR1, молекул на 1 кл.	VEGFR2, молекул на 1 кл.	Соотношение VEGFR1/VEGFR2
Эндотелиальные клетки, выделенные из скелетных мышц мыши <i>ex vivo</i>	2800±200	1600±100	1,8 / 1
Культура эндотелиальных клеток человека (HUVEC)	1800±200	4900±400	1 / 2,7
Культура эндотелиальных клеток человека (HUVEC) в присутствии 1нМ VEGF-A165	4900±500	900±200	5,4 / 1
Линия дермальных фибробластов мыши 3T3	35800±5200	700±100	51 / 1

На поверхности неэндотелиальных клеток количество VEGFR1 более чем в 50 раз превышает VEGFR2. Учитывая 10-кратное превышение аффинности фактора VEGF к своему первому рецептору, становится очевидно, что VEGF в таких клетках практически не способен запустить VEGFR2-опосредованный каскад реакций.

В эндотелиальных клеточных культурах HUVEC, MEC (эндотелий сосудов микроциркуляторного русла), LEC (эндотелий лимфатических сосудов) количество VEGFR2 в несколько раз превышает VEGFR1, однако при повышении концентрации VEGF-A165 с 2пкМ до 1 нМ происходит дозозависимое изменение соотношений данных рецепторов [45].

На мышинной модели ишемии задних конечностей было показано, что на поверхности эндотелиальных клеток, выделенных *ex vivo* из скелетных мышц, увеличивается число рецепторов VEGFR1 и уменьшается число VEGFR2. При этом изменения уровня экспрессии рецепторов происходят и в контрольной (неповрежденной) конечности, что говорит о наличии системного ответа [47].

Уровень экспрессии двух рецепторов на поверхности эндотелиоцитов может варьировать и при физиологических условиях внутри одного вида. У двух линий мышей (BALB/c и C57BL/6), отличающихся по степени устойчивости к ишемии, разница в уровне экспрессии составляет около 20% [46]. Эти данные позволили авторам исследования выдвинуть предположение о вариабельности количества и соотношения рецепторов VEGFR1 и VEGFR2 внутри человеческой популяции, объясняющей индивидуальные различия в способности к восстановлению ишемизированной ткани [47].

### Заключение

Тонкая регуляция действия основного проангиогенного фактора роста VEGF-A165 как в пренатальном, так и в постнатальном периоде начинается еще на уровне связывания белка с рецепторами VEGFR1

и VEGFR2. VEGFR2 запускает внутриклеточные каскады, обеспечивающие выживаемость, пролиферацию и миграцию эндотелиоцитов, привлечение прогениторных клеток, формирование и созревание новых кровеносных сосудов. VEGFR1 же является основным регулятором активности VEGF-A165, предотвращая чрезмерный ангиогенный ответ за счет следующих механизмов:

1) изменение соотношения рецепторов VEGFR1/VEGFR2 на поверхности клеток в присутствии VEGF-A165;

2) конкурентное связывание VEGF-A165 (аффинность фактора роста к VEGFR1 в 10 раз больше, чем к VEGFR2);

3) высвобождение конкурентных изоформ VEGF-A113, которые связываются с VEGFR2, но не узнаются корецептором NRP-1, отвечающим за стабильность комплекса «лиганд-рецептор»;

4) активация ангиостатина, ингибирующего эффект VEGF-A165.

Более того, с помощью математического моделирования было показано, что от 10 до 50% всех активных рецепторов могут составлять гетеродимеры VEGFR1/VEGFR2, что может обеспечивать еще более точный контроль трансдукции сигнала VEGF [48].

Таким образом, система взаимодействий VEGF-A165 с рецепторами VEGFR1 и VEGFR2 является одной из ключевых в ангиогенезе. Сдвиг равновесия в сторону одного из компонентов системы «лиганд-рецепторы» может существенно повысить эффективность про- или анти-ангиогенной терапии.

### Благодарности

Работа была выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по государственному соглашению № 8784 от 04 октября 2012 г; при финансовой поддержке РФФИ в соответствии с Соглашением №12-04-32255\12 от 31 октября 2012 г.

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Pandya N.M., Dhalla N.S., Santani D.D. Angiogenesis--a new target for future therapy. *Vascul. Pharmacol.* 2006; 44(5): 265–74.
2. Фатхудинов Т.Х., Большакова Г.Б., Комиссарова С.В. и др. Ангиогенез при трансплантации ауто- и аллогенных клеток. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2010; 149(4): 442–447.
3. Blankenberg F.G., Levashova Z., Sarkar S.K. et al. Noninvasive assessment of tumor VEGF receptors in response to treatment with pazopanib: a molecular imaging study. *Transl. Oncol.* 2010; 3(1): 56–64.
4. Chung A.S., Ferrara N. Developmental and pathological angiogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2011; 27: 563–84.
5. Folkman J., Merler E., Abernathy C. et al. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J. Exp. Med.* 1971; 133(2): 275–88.
6. Isner J.M., Vale P., Symes J. et al. Angiogenesis and cardiovascular disease. *Dialogues in Cardiovascular Medicine* 2001; 6(3): 145–72.
7. Cao R., Brakenhielm E., Wahlestedt C. et al. Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *PNAS USA* 2001; 98(11): 6390–5.
8. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 2003; 9(6): 653–60.
9. Shima D.T., Deutsch U., D'Amore P.A. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. *FEBS Lett.* 1995; 370(3): 203–8.
10. Stefanini M.O., Wu F.T., Mac Gabhann F. et al. A compartment model of VEGF distribution in blood, healthy and diseased tissues. *BMC Syst. Biol.* 2008; 2: 77.
11. Takahashi H., Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci. (Lond.)* 2005; 109(3): 227–41.
12. Takeshita S., Zheng L.P., Brogi E. et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J. Clin. Invest.* 1994; 93(2): 662–70.
13. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2006; 39(5): 469–78.
14. Neufeld G., Kessler O. The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 2008; 8: 632–45.
15. Fong G.H., Rossant J., Gertsenstein M. et al. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376: 66–70.
16. Seetharam L., Gotoh N., Maru Y. et al. A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF. *Oncogene* 1995; 10: 135–47.
17. Kanno S., Oda N., Abe M. et al. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene* 2000; 19(17): 2138–46.
18. Hiratsuka S., Nakamura K., Iwai S. et al. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell* 2002; 2(4): 289–300.
19. Hanania R., Sun H.S., Xu K. et al. Classically activated macrophages use stable microtubules for matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) secretion. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(11): 8468–83.
20. Fridman R., Toth M., Chvyrkova I. et al. Cell surface association of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B). *Cancer Metastasis Rev.* 2003; 22: 153–66.
21. Bauer A.T., Bürgers H.F., Rabie T. et al. Matrix metalloproteinase-9 mediates hypoxia-induced vascular leakage in the brain via tight junction rearrangement. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2010; 30(4): 837–48.
22. Pepper M.S. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21: 1104–17.
23. Lee S., Jilani S.M., Nikolova G.V. et al. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J. Cell Biol.* 2005; 169(4): 681–91.
24. Cêbe Suarez S., Pieren M., Cariolato L. et al. A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006; 63(17): 2067–77.
25. Ferrara N. Binding to the extracellular matrix and proteolytic processing: two key mechanisms regulating vascular endothelial growth factor action. *Mol. Biol. Cell.* 2010; 21(5): 687–90.
26. Cornelius L.A., Nehring L.C., Harding E. et al. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J. Immunol.* 1998; 161(12): 6845–52.
27. Pozzi A., Moberg P.E., Miles L.A. et al. Elevated matrix metalloproteinase and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization. *PNAS USA* 2000; 97(5): 2202–7.
28. Hollborn M., Stathopoulos C., Steffen A. et al. Positive feedback regulation between MMP-9 and VEGF in human RPE cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007; 48(9): 4360–7.
29. Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T.P. et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376: 62–6.
30. Gerber H.P., McMurtrey A., Kowalski J. et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 30336–43.
31. Fukumura D., Gohongi T., Kadambi A. et al. Proc Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98(5): 2604–9.
32. Sonveaux P., Martinive P., DeWever J. et al. Caveolin-1 expression is critical for vascular endothelial growth factor-induced ischemic hindlimb collateralization and nitric oxide-mediated angiogenesis. *Circ. Res.* 2004; 95(2): 154–61.
33. Labrecque L., Royal L., Surprenant D.S. et al. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *Mol. Biol. Cell.* 2003; 14(1): 334–47.
34. Navarro A., Anand-Apte B., Parat M.O. A role for caveolae in cell migration. *FASEB J.* 2004; 18(15): 1801–11.
35. Bir S.C., Xiong Y., Kevil C.G. et al. Emerging role of PKA/eNOS pathway in therapeutic angiogenesis for ischaemic tissue diseases. *Cardiovasc. Res.* 2012; 95(1): 7–18.
36. Lee P.C., Salyapongse A.N., Bragdon G.A. et al. Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Am. J. Physiol.* 1999; 277(4 Pt 2): H1600–8.
37. Laufs U., Werner N., Link A. et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 2004; 109(2): 220–6.
38. Yu J., deMuinck E.D., Zhuang Z. et al. Endothelial nitric oxide synthase is critical for ischemic remodeling, mural cell recruitment, and blood flow reserve. *PNAS USA* 2005; 102(31): 10999–1004.
39. Zetterström R. The 1998 Nobel Prize-discovery of the role of nitric oxide as a signalling molecule. *Acta. Paediatr.* 2009; 98(3): 593–9.
40. Huang P.L. eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 2009; 20(6): 295–302.
41. Kitazawa T., Semba S., Huh Y.H. et al. Nitric oxide-induced biphasic mechanism of vascular relaxation via dephosphorylation of CPI-17 and MYPT1. *J. Physiol.* 2009; 587 (Pt 14): 3587–603.
42. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288(5789): 373–6.
43. Hattori K., Heissig B., Wu Y. et al. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1+ stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat. Med.* 2002; 8: 841–9.
44. Sawano A., Iwai S., Sakurai Y. et al. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 2001; 97: 785–91.
45. Imoukhuede P.I., Popel A.S. Quantification and cell-to-cell variation of vascular endothelial growth factor receptors. *Exp. Cell. Res.* 2011; 317(7): 955–65.
46. Imoukhuede P.I., Popel A.S. Expression of VEGF receptors on endothelial cells in mouse skeletal muscle. *PLoS One* 2012; 7(9): e44791.
47. Imoukhuede P.I., Dokun A.O., Annex B.H. et al. Endothelial cell-by-cell profiling reveals temporal dynamics of VEGFR1 and VEGFR2 membrane-localization following murine hindlimb ischemia. *Am J Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2013; 304(8): H1085–93.
48. Mac Gabhann F., Popel A.S. Dimerization of VEGF receptors and implications for signal transduction: a computational study. *Biophys. Chem.* 2007; 128(2–3): 125–39.

Поступила 25.03.2013