

# МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

## СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АНГИОГЕНЕЗА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

А.А. Ливанова<sup>1</sup>, Р.В. Деев<sup>2,3</sup>, А.А. Ризванов<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Институт стволовых клеток человека, Москва, Россия

<sup>3</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

### Current methods in experimental angiogenesis investigation

A.A. Livanova<sup>1</sup>, R.V. Deev<sup>2,3</sup>, A.A. Rizvanov<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Kirov Medical Military Academy, Saint-Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Human Stem Cells Institute, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

Растущий интерес к ангиогенезу как ключевому компоненту морфогенеза и развития различных заболеваний обуславливает необходимость поиска экспериментальных моделей для воспроизведения неоваскуляризации в лабораторных условиях. Особенно актуальным этот вопрос становится в связи с разработкой новых способов лечения на основе регуляции ангиогенеза. В этом ключе становятся необходимы тест-системы для оценки ангиогенной активности предполагаемых терапевтических препаратов в рамках доклинических исследований. Сегодня в этих целях используются множество моделей *in vitro* и *in vivo*, каждая из которых обладает рядом недостатков, затрудняющих интерпретацию результатов. Так, с помощью моделей *in vitro* оценивают отдельные характеристики эндотелиоцитов в культуре, которые отличаются от таковых в естественном микроокружении. Использование моделей *in vivo* связано со сложностью доставки тестируемого агента и проведения количественной оценки его ангиогенной активности. В силу наличия проблем при работе с существующими моделями, для выполнения исследований в данной области применяют несколько тест-систем. Цель данного обзора – критичное освещение преимуществ и недостатков современных методов изучения ангиогенеза, используемых как для фундаментальных исследований, так и для доклинических испытаний предполагаемых терапевтических агентов.

**Ключевые слова:** ангиогенез, исследования *in vitro*, исследования *in vivo*, опухолевые модели.

### Введение

Ангиогенез представляет собой механизм неоваскуляризации посредством формирования сосудов из уже существующих. В ходе эмбрионального развития за счет ангиогенеза первичное капиллярное сплетение преобразуется в сосудистую сеть. Постнатальный ангиогенез сопровождается циклическими изменениями состояния некоторых органов (формирование желтого тела, регенерация тканей, заживление ран и др.). Неоваскуляризация также сопутствует развитию различных патологических состояний, таких как ретинопатия, ревматоидный артрит, прогрессия опухолей и пр. [1]. Последовательная смена процессов, опосредующих формирование нового сосуда в ходе ангиогенеза, жестко регулируется в здоровом организме, в то время как при патологии эта регуляция нарушается [2]. В частности, опухолевый ангиогенез приводит к формированию полиморфных

Growing interest in angiogenesis, a key component in the development of different diseases, requires the use of a suitable experimental model to simulate neovascularization in a laboratory. In recent years, with the development of novel therapeutic strategies, based on angiogenesis regulation, this problem has become especially important. Current *in vitro* and *in vivo* models are characterized with a variety of disadvantages, which impede results interpretation. Thus, *in vitro* assays provide estimation of discrete endothelial cells characteristics, which alter from the same ones in the native microenvironment. The use of *in vivo* assays is accompanied with difficulties in testing agent delivery and quantitative analysis of its angiogenic activity. In view of these complications, the use of a combination of assays is recommended while planning the experiment in this area. The aim of this review is to critically analyze angiogenesis assays, currently used to perform fundamental investigation as well as preclinical tests of developing therapeutic agents.

**Keywords:** angiogenesis, *in vitro* assays, *in vivo* assays, tumor models.

атипичных высокопроницаемых сосудов, которые не сокращаются под влиянием сосудосуживающих средств [3]. Течение ангиогенеза и морфофункциональный статус образующихся сосудов в большой мере зависят от тканевого микроокружения и условий, в которых находится эндотелий, что позволило создать большое количество экспериментальных моделей для воспроизведения ангиогенеза, в которых могут быть оценены различные аспекты и этапы данного процесса.

Интерес к исследованию неоваскуляризации возрос во второй половине прошлого века, когда были разработаны концепции терапевтических стратегий для лечения многих заболеваний, сопровождающихся ангиогенезом. Поскольку развитие этих заболеваний опосредуется нарушением регуляции формирования сосудов, сегодня основные исследования в этой области связаны с выяснением механизмов

неоваскуляризации на молекулярном и клеточном уровнях, а также с поиском мишеней для приложения терапевтических агентов, осуществляющих регуляцию ангиогенеза.

Для решения различных исследовательских задач при изучении ангиогенеза используется большое число тест-систем *in vitro* и *in vivo*. Однако в связи со сложным характером взаимодействий клеточных компонентов, опосредующих формирование сосуда, комплексная оценка всех механизмов ангиогенеза в рамках одного эксперимента не представляется возможной. Несмотря на интенсивную разработку новых экспериментальных моделей, большинство ученых считают, что надежнее использовать несколько тест-систем [4, 5]. Так, методы исследования *in vitro* позволяют оценить отдельные характеристики культивируемых эндотелиоцитов (пролиферация, миграция, формирование трубчатых структур) и их изменение при воздействии ангиогенного или ангиостатического стимулов. Однако такие тест-системы даже при условии совместного культивирования эндотелиоцитов с другими типами клеток не позволяют оценить ангиогенную активность тестируемого вещества в естественном микроокружении. Постановка эксперимента *in vivo* удовлетворяет этому требованию, тем не менее доставка тестируемого агента и количественная оценка неоваскуляризации в этом случае требуют больших временных и финансовых затрат.

Удобные модели ангиогенеза требуются как для проведения преклинических тестов терапевтических агентов, так и для фундаментальных исследований механизмов неоваскуляризации.

## 1. Исследования *in vitro*

Тест-системы *in vitro* используются преимущественно для оценки миграции, пролиферации и формирования тубулярных структур в культуре эндотелиоцитов в ответ на действие ангиоиндуцирующего или ангиостатического агента. В таком случае исследуются монокультивируемые эндотелиоциты, либо осуществляется их сочетанное культивирование вместе со стромальными клетками (фибробластами, гладкомышечными клетками, перицитами). В последнем случае появляется возможность оценивать характер взаимодействий между сокультивируемыми клетками, а также их изменение в ответ на действие экзогенного стимула.

### 1.1. Монокультивирование эндотелиоцитов

В различных участках сосудистой системы эндотелиальные клетки находятся в неодинаковых гемодинамических и метаболических условиях, вследствие чего они отличаются по форме, размерам, ориентации относительно оси сосуда, характеристикам ядра и цитоплазмы [6]. По этой причине используемые в лабораториях первичные культуры и клеточные линии эндотелиоцитов характеризуются большим фенотипическим разнообразием. Так, известно более 19 типов эндотелиальных клеток человека, выделенных в первичную культуру, в том числе полученных из капилляров легких, мочевого пузыря, сердца, матки, кожи, а также лимфатических капилляров [7]. Одним из наиболее часто используемых типов первичных культур клеток являются эндотелиоциты вены пупочного канатика HUVEC (human

umbilical vein endothelial cells), которые изолируют с помощью перфузии вены пупочного канатика трипсином или коллагеназой. Впервые этот метод был применен E. Jaffe с соавт. (1973) [8] и до сих пор используется во многих исследованиях [9–10].

Основными фенотипическими и функциональными характеристиками эндотелиоцитов считают:

- наличие телец Вейбеля-Паладе (WP-тельца), запасающих фактор фон Виллебранда;
- экспрессия фактора фон Виллебранда как в присутствии, так и в отсутствии WP-тельца;
- экспрессия ICAM (intercellular adhesion molecule 1, CD54), VCAM (vascular cell adhesion molecule 1, CD106) и E-селектина (CD62E);
- наличие клеточных контактов, устанавливаемых с помощью VE-кадгерина;
- активность ангиотензин-конвертирующего фермента (ACE) и др.

Первичные культуры клеток характеризуются нестабильным кариотипом и теряют некоторые свои фенотипические характеристики на поздних пассажах [11]. Необходимость стабильных и воспроизводимых экспериментальных условий привела к созданию иммортализованных клеточных линий, способных к постоянному существованию в культуре, а также к устойчивому поддержанию определенных фенотипических паттернов. Клеточная линия должна быть максимально приближена по своим морфофункциональным особенностям к первичным клеткам, но обладать при этом не изменяющимся кариотипом и фенотипом и не проявлять туморогенность (табл.).

В целом, выделяют два типа клеточных линий: 1) линии, способные к ограниченному числу пассажей; 2) «иммортализованные» линии, обладающие стабильными фенотипом и уровнем экспрессии характерных молекулярных паттернов в течение неограниченного числа пассажей. Первая группа клеточных линий применяется, в основном, при исследовании возрастных изменений эндотелия, поскольку в этом случае в качестве экспериментальной модели необходимы неиммортализованные клетки. Для исследования ангиогенеза, особенно при постановке длительных экспериментов, необходимы иммортализованные клеточные линии. Одна из наиболее часто используемых — линия EA.hy926, полученная с помощью слияния HUVEC и клеток линии аденокарциномы легкого человека A549 [12, 13]. Также клеточными линиями, полученными от HUVEC, являются HEC-SKV, HEC-MSV, IVEC, SE-1, hTERT-HUVEC и др. [11]. Все они представляют собой эндотелий крупных сосудов. Вместе с тем, для моделирования ангиогенеза наиболее подходящими являются клеточные линии эндотелия микроциркуляторного русла, поскольку местом разветвления неоваскуляризации является именно капиллярная часть сосудистой сети. Мелкососудистые эндотелиальные клетки были изолированы из плаценты человека, неонатальной крайней плоти, дермы взрослого человека, жировой ткани и других областей и представлены линиями HMEC-1, hTERT-HMEC, SV-HCEC и др [11].

Помимо перечисленных выше критериев, при выборе клеточной линии учитывают экспериментальные условия и цели исследования. Так, при оценке продукции белка выбирают клеточную линию, способную к росту в условиях сывороточного и белкового голодания, а при исследовании механизмов

старения эндотелия используют клеточные линии с ограниченным сроком жизни и со стабильным кариотипом. Для исследования механизмов ангиогенеза и тестирования ангиогенных агентов используются линии адгезивных клеток, образующих монослой в культуре и способных к формированию трубчатых структур in vitro. Кроме того, существует большое

число клеточных линий, полученных от пациентов с различными патологическими состояниями. Так, для моделирования саркомы Капоши in vitro используют линию AIDS-KSI (AIDS-derived Kaposi's Sarcoma Cells) [14], а для исследования гематозэнцефалического барьера была создана линия SV-HCEC (Human Cerebral Endothelial Cells) [15].

Таблица. Характеристика клеточных линий эндотелиоцитов

Моделируемый объект	Первичная культура	Клеточная линия	Кариотип	Формирование монослоя	Рост в бессывороточной среде	Рост в Матригеле	WP-тельца	Туморогенность	Фактор фон Виллебранда	ACE	ICAM, VCAM, E-селектин	Ссылка	
<b>Линии с ограниченным числом пассажей</b>													
Крупные сосуды	HUVEC	SVHEC-A,B,F	анеуплоидный	-	+	Н/И	-	Н/И	-	+/-	Н/И	[16]	
		SV-HUVEC	45	+	+	Н/И	Н/И	+/-	+	Н/И	Н/И	[17]	
		SV-2	Диплоидный	Н/И	-	Н/И	Н/И	Н/И	+	Н/И	Н/И	[18]	
		SGHEC-7	42, нестабильный	+	+	Н/И	Н/И	Н/И	+	Н/И	TNF, И1	[19]	
		Н/И	85	+	+	Н/И	+	Н/И	+	Н/И	Н/И	[20]	
	HUVEC+143B	EC*143B	102	Н/И	+	Н/И	Н/И	Н/И	+	Н/И	Н/И	[21]	
	HUVEC	EC-pSV1	Н/И	-	+	Н/И	-	Н/И	-	+	ICAM	[22]	
		ESVSF108	>50% диплоидны	Н/И	+	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	+	Н/И	Н/И	[23]
		ESV233	>50% триплоидны	Н/И	+	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	[23]
		ESV2010ECGS	Н/И	Н/И	+	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	[23]
ESV2010INS/EGF		Н/И	Н/И	+	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	[23]	
ESV2010-GF	Н/И	Н/И	+	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	[23]		
Мелкие сосуды	HPEC	HPEC-A1	Н/И	+	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	+	Н/И	Н/И	[24]	
Пациент-специфичные линии	Саркома Капоши	AIDS-KSI-6	46XY	Н/И	Н/И	Н/И	-	-	-	-	Н/И	[14]	
		SV-KSC	Н/И	-	+	Н/И	Н/И	-	Н/И	Н/И	Н/И	[25]	
		KS1, KS2,KS3,KS4	Н/И	+/-	+	-	Н/И	Н/И	+	Н/И	Н/И	[26]	

Окончание таблицы

Моделируемый объект	Первичная культура	Клеточная линия	Кариотип	Формирование монослоя	Рост в бессывороточной среде	Рост в Матригеле	WP-тельца	Туморогенность	Фактор фон Виллебранда	ACE	ICAM, VCAM, E-селектин	Ссылка
<b>Иммortalизованные линии</b>												
Крупные сосуды	HUVEC+A549	EA.hy926	80	+	+	Н/И	Н/И	Н/И	+	Н/И	TNF	[27]
	HUVEC	HEC-KSV	диплоидные	+/-	-/+	Н/И	+	-	+	Н/И	Н/И	[28]
	HUVEC	HEC-MSV	диплоидные	+/-	-/+	Н/И	-	-	+	Н/И	Н/И	[28]
	HUVEC	IVEC	48	+	+	Н/И	+	Н/И	+	+	II1-b	[29]
	HUVEC	SE-1	Н/И	+	+	Н/И	-	-	+/-	-	Н/И	[30]
	HUVEC	SV-3T	анеуплоидные	Н/И	-	Н/И	Н/И	Н/И	-	Н/И	Н/И	[18]
	HUVEC	CIISTH	диплоидный +трисомия 8, 11	+/-	-	+	,	-	+	,	TNF	[31]
	HUVEC	EC-RF24	диплоид	+	-	Н/И	+	Н/И	+	Н/И	+	[32]
	HUVEC	CEHI	Н/И	+	Н/И	Н/И	+	-	+	+	Н/И	[33]
	HUVEC+A549	Alg, C26a, C49b, C50b, C50c, C50d, D98f	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	-	Н/И	+	[34]
	HUVEC+A549	CJE-hy3	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	-	Н/И	+	[35]
	HUVEC	EVLC2	нестабильный	+	+	Н/И	Н/И	Н/И	-	Н/И	Н/И	[35]
		hTERT-HUVEC	анеуплоидный	+	Н/И	+	Н/И	Н/И	+	Н/И	+	[36]
	HAEC	hTERT-HAEC	анеуплоидный	+	Н/И	+	Н/И	Н/И	+	Н/И	+	[36]
HCC	hTERT-HCEC	анеуплоидный	+	Н/И	+	Н/И	Н/И	+	Н/И	+	[36]	
HSVEC	hTERT-HSVEC	анеуплоидный	+	Н/И	+	Н/И	Н/И	+	Н/И	+	[36]	
Мелкие сосуды	HMEC	HMEC-1	диплоидный	+	+	+	Н/И	Н/И	+	Н/И	+	[37]
	HCEC	SV-HCEC	гипер- диплоидный	+	-	+	Н/И	Н/И	+	Н/И	Н/И	[15]
	Фетальные SEC	iSEC	Н/И	+	Н/И	Н/И	-	Н/И	+	Н/И	Н/И	[38]
	HMEC	hTERT-HDMEC	диплоидный	+	Н/И	+	Н/И	Н/И	+	Н/И	+	[39]
ККМ	BMEC	BMEC-1	Н/И	+	+/-	+	Н/И	Н/И	+	Н/И	+	[39]
		TrHBMEC	50	+	+	+	+	Н/И	+	Н/И	TNF	[40]
		HBME-1	диплоидный и гипертри- плоидный	+	-	+	+	,	+	,	+	[41]
Пациент-специфичные	Ангио-саркома	SK-HEP	62	+/-	+	+	+	+	+	Н/И	E-sel	[42]
		HAEND	Н/И	-	+	Н/И	Н/И	+	+	Н/И	ICAM	[43]

«+» – признак выражен у данной клеточной линии; «-» – признак не выражен у данной клеточной линии; «Н/И» – нет информации.

### 1.1.1. Оценка пролиферации эндотелиоцитов *in vitro*

Эндотелиоциты формирующегося сосуда активно пролиферируют, поэтому на основе анализа изменения пролиферативной активности клеток в культуре при добавлении того или иного молекулярного агента делают вывод о его ангиогенной активности. В этой связи тест-системы, позволяющие оценить пролиферативную активность эндотелиоцитов *in vitro*, стали обязательным компонентом доклинических исследований предполагаемых терапевтических агентов.

**Прямой подсчет изменения числа клеток в культуре.** Для наиболее простой оценки пролиферации эндотелиоцитов с помощью счетной камеры анализируют изменение числа клеток в культуре до и после воздействия молекулярного агента [44]. Для учета клеточной гибели в культуре нередко используют подсчет апоптотических телец в камере Горяева с добавлением небольшого количества растворов витальных красителей — нейтрального красного или трипанового синего. Однако такой анализ не позволяет провести комплексную оценку пролиферативной активности, складывающуюся из таких показателей, как соотношение живых и мертвых клеток, динамика роста популяции клеток, скорость формирования монослоя.

**МТТ-тест.** Другой часто используемый метод для оценки пролиферации эндотелиальных клеток — МТТ-тест. Неокрашенные формы солей тетразолия (МТТ-реагента) восстанавливаются дегидрогеназами митохондрий живых клеток до голубого кристаллического формазана. Клетки культивируют с добавлением МТТ-реагента и затем инкубируют в течение 2–24 ч. Во время инкубации (обычно в течение 2–5 ч.) среда приобретает голубой цвет, интенсивность которого может быть измерена спектрофотометрически [45]. Положительная корреляция между количеством образующегося формазана и пролиферативной активностью клеток была доказана для лимфоцитов при оценке их митогенной активности в ответ на действие различных цитокинов [46]. Строго говоря, концентрация красителя пропорциональна количеству клеток, характеризующихся интенсивной метаболической, а не пролиферативной активностью. Результаты МТТ-теста, иллюстрирующие в большей степени активность митохондрий, нежели активность клеточных делений, зависят от энергетического статуса клеток. Разные клеточные линии могут демонстрировать различную активность митохондриальных дегидрогеназ, а тестируемые ангиогенные агенты могут непредсказуемым образом влиять на работу митохондрий, искажая результат.

**Методы оценки интенсивности синтеза ДНК.** Интенсивность репликации ДНК, предшествующей каждому клеточному делению, напрямую отражает пролиферативную активность клеток. Широко применяются следующие методы, характеризующие синтез ДНК:

1) Анализ включения <sup>3</sup>H-тимидина в синтезирующиеся дочерние цепи ДНК. Использование тимидина обусловлено тем, что это единственный нуклеотид в составе ДНК, который не входит в РНК. Для подсчета числа включенного в состав ДНК <sup>3</sup>H-тимидина оценивают число испускаемых радиоактивной меткой β-частиц. Основными недостатками являются небезопасность и трудоемкость данного метода.

2) Анализ включения высокоактивного бромдезоксисуридина (BrdU) [47], вступающего в конкуренцию с тимидином за встраивание в синтезирующуюся ДНК. Интенсивность встраивания BrdU впоследствии оценивают иммуногистохимически. Основным недостатком, также как и в случае использования метода анализа включения <sup>3</sup>H-тимидина, является встраивание метки в состав ДНК не только в ходе репликации, но и в ходе репарации, которая с разной интенсивностью осуществляется в клетках, что может существенно исказить результаты эксперимента.

3) Использование флуоресцирующих клеточных красителей, таких как производные флуоресцеина, (CFSE, Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester) с последующей флуориметрической оценкой. CFSE связывается с белками цитоплазмы и в ходе митоза равномерно распределяется между дочерними клетками. При последующем цитофлуориметрическом анализе клеток, меченных CFSE, клетки с разными значениями флуоресценции (а значит, претерпевшие разное число митотических делений) выявляются в виде дискретных пиков. Недостатком данного метода является затруднение интерпретации результатов при наложении пиков клеток [48, 49].

4) Оценка экспрессии PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), Ki-67 и других маркеров различных фаз клеточного цикла. Анализ экспрессии этих маркеров позволяет выделить клетки, находящиеся в активной фазе клеточного цикла, на всём его протяжении (G1-, S-, G2- и M-фазы). Так, экспрессия PCNA усиливается в G1-фазе, достигает пика в S-фазу и снижается в G2-фазе. Экспрессия ядерного антигена Ki-67 также меняется в ходе прохождения клеткой клеточного цикла. Это позволяет использовать экспрессию PCNA и Ki-67 не только для идентификации пролиферативной активности, но и для точного определения фазы жизненного цикла, на которой находится клетка в культуре [50]. Недостатком этого метода является искажение результатов в связи с участием PCNA в процессах репарации, которая имеет место на разных стадиях клеточного цикла. Клеточная роль Ki-67 до конца не выяснена, имеются данные о его участии в транскрипции рибосомальной РНК, что также необходимо учитывать при интерпретации результатов [51].

**Проточная цитофлуориметрия.** Наиболее полную информацию о пролиферативном статусе каждой клетки в культуре можно получить, сочетая методы проточной цитофлуориметрии и использование ДНК-связывающих молекул. Содержание ДНК на разных стадиях меняется от диплоидного к тетраплоидному. Эти изменения в проточной цитофлуориметрии удается проанализировать с помощью флуорохромов, связывающихся с ДНК. Одним из них является йодистый пропидий, флуоресцирующий в оранжевой части спектра. При сочетании воздействия на клетки йодистым пропидием и бромдезоксисуридином в ходе флуоресцентно-активированного сортирования клеток (FACs) получают информацию о клеточном цикле каждой клетки [52]. Преимуществом данного метода, помимо быстроты и точности определения пролиферативного статуса клеток, является возможность дополнительной характеристики клеток по экспрессии мембранных маркеров и внутриклеточных молекул.

### 1.1.2. Оценка миграции эндотелиоцитов *in vitro*

По мере разворачивания ангиогенного ответа следующего после воздействия проангиогенного стимула эндотелиоциты растущего сосуда мигрируют по направлению изменения градиента концентрации ростовых факторов, цитокинов и других индукторов ангиогенеза. В этой связи разработано большое количество тест-систем, использующихся для оценки миграции эндотелиоцитов в ответ на воздействие молекулярного агента [53]. Миграция эндотелиоцитов также опосредует неоваскуляризацию, сопровождающую заживление ран, что стало основой для разработки методов оценки миграции эндотелиоцитов в моделях регенерационного ангиогенеза.

**Камеры Бойдена.** Одними из давно известных тест-систем для оценки миграции клеток являются камеры Бойдена, представляющие собой конструкцию из двух камер, разделенных фильтром, проницаемым для клеток [54, 55]. Клетки вносят в верхнюю камеру, под которой находится фильтр с порами диаметром 8 мкм (такой диаметр «пропускает» только активно мигрирующие клетки). В нижней камере находится хемоаттрактант. Клетки мигрируют через поры фильтра по градиенту хемоаттрактанта, после чего производят подсчет клеток, оказавшихся в нижней камере. Недостатки такого метода заключались в невозможности следить за динамикой миграции клеток, трудоемкости в поддержании постоянного градиента хемоаттрактанта и отсутствии нативного микроокружения для эндотелиоцитов [56]. Для ликвидации этих недостатков тест-система неоднократно модифицировалась; сегодня она представлена в 2D- и 3D-моделях и предполагает наблюдение за миграцией клеток с помощью видеомикроскопирования. В качестве фильтров апробированы разнообразные материалы, включая целлюлозонитраты, целлюлозные эфиры и поликарбонаты, а также комплексные матрицы, такие как «Матригель™» [57], для воспроизведения пространственного и биохимического микроокружения.

Разновидностью камеры Бойдена является прибор xCELLigence (Roche Applied Science, Швейцария) с чипами CIM-Plate (cellular invasion/migration), предназначенный для определения миграции и инвазии клеток в режиме реального времени. На нижней стороне микропористой мембраны из полиэтилентерефталата (ПЭТ) устройства CIM-Plate интегрированы микрорезисторные датчики. Клетки мигрируют из верхней камеры CIM-Plate через микропористую мембрану в нижнюю камеру в ответ на хемоаттрактант, при этом в ходе их прохода через электроды возникает электрический сигнал, который фиксируется электронными датчиками на нижней стороне мембраны. Увеличение сопротивления коррелирует с увеличением числа прошедших через мембрану клеток. Значение клеточного индекса (cell index) отражает изменение сопротивления и непрерывно записывается прибором xCELLigence RTCA DP. Таким образом, активность миграции клеток можно оценивать с помощью профиля клеточного индекса.

**Модель заживления раны (scratch wound healing assay).** Альтернативный способ анализа миграции основан на подсчете клеток, мигрирующих в зону, свободную от монослоя. Для этого после того, как внесенные клетки сформировали монослой, не-

большую его часть, обычно полосу определенной ширины, удаляют [58]. Клетки мигрируют в образовавшуюся свободную зону. Преимуществом этой модели является возможность наблюдения за динамикой их миграции во времени [59]. Такая тест-система была предложена для воспроизведения заживления ран, поскольку монослою наносится «повреждение», которое затем ликвидируется за счет миграции клеток [60]. Однако, регенерация тканей — это многоступенчатый процесс, включающий, наряду с миграцией, пролиферацию и дифференцировку клеток разного происхождения. В рамках данной тест-системы такая комплексная оценка заживления ран невозможна. К другим недостаткам такого эксперимента относится сложность обеспечения достоверности контролей, а также необходимость учета зависимости скорости миграции от размера «свободной зоны» [61, 62].

### 1.1.3. Оценка дифференцировки эндотелиоцитов *in vitro*

Для оценки воздействия ангиогенного или ангиостатического агента на дифференцировку эндотелиоцитов *in vitro* исследуют их способность формировать тубулярные структуры (tube formation assay). В 1980 г. впервые удалось воспроизвести ангиогенез в монокультуре клеток: эндотелиоциты капилляров кожи человека формировали трубчатые структуры в среде с добавлением опухолевых клеток [63]. В действительности, эндотелиальные клетки любого происхождения способны *in vitro* формировать тубулярные структуры спонтанно [64].

Для воспроизведения трехмерных условий в эксперименте используют пористые матрицы (коллагеновые, фибриновые, Матригель™), имитирующие естественное микроокружение клеток. Тубулярные структуры начинают образовываться в течение первых 4-24 ч после посева, а образование капиллярного просвета и плотных контактов между эндотелиоцитами можно подтвердить с помощью методов электронной микроскопии [65, 66].

Соотношение пролиферации и дифференцировки эндотелиоцитов зависит от состава матрикса. Так, культивирование эндотелиоцитов на субстратах, содержащих коллаген I и III типов (белки внеклеточного матрикса), стимулирует пролиферативную активность клеток при сниженной дифференцировке. При использовании коллагенов IV и V типов (белки базальной мембраны) наблюдается, напротив, интенсивное образование тубулярных структур с малой степенью пролиферации эндотелиальных клеток [67].

Матригель™ является продуктом секреции линии опухолевых клеток, полученных от мышинной модели саркомы Энгельбрета — Хольм — Сварма, и нередко используется в качестве субстрата для воспроизведения опухолевого ангиогенеза. Матригель™ содержит в своем составе комплекс факторов роста, а также смесь белков матрикса и базальной мембраны, которые способствуют формированию капилляроподобных трубок уже в течение первых 12 ч. после внесения клеток [65]. Для моделирования физиологических условий ангиогенеза используют Матригель™ с редуцированным количеством ростовых факторов и цитокинов.

### **1.2. Совместное культивирование эндотелиоцитов и стромальных клеток (гладкомышечных и пероцитов)**

На заключительной стадии ангиогенеза осуществляется стабилизация образовавшейся тубулярной структуры, сопровождающаяся привлечением гладкомышечных клеток и пероцитов и установлением клеточных контактов между ними и эндотелиоцитами. Для анализа воздействия тестируемого агента на установление межклеточных контактов эндотелиоцитов с другими компонентами стабилизирующегося сосуда две клеточные популяции культивируют совместно.

Простейший вариант сокультивирования подразумевает одновременное либо последовательное внесение обоих типов клеток в один культуральный флакон [68]. В этом случае, чтобы отличать популяции клеток между собой, хотя бы одна из них должна нести флуоресцентную метку [69]. Недостатком данного метода является невозможность оценить характер паракринных межклеточных взаимодействий, а также направленной клеточной миграции.

Альтернативный бесконтактный вариант сокультивирования — это «подагарозный посев», где в посуде, заполненной агарозой, в субстрате проделывают два отверстия, в которые засевают клетки разных типов. Через некоторое время клетки начинают мигрировать по направлению друг к другу под агарозой [70]. Достоинство такого метода в том, что клетки, оставленные на 5–7 дней, начинают взаимодействовать друг с другом, и возможно наблюдение за изменениями фенотипов клеток, следующими после этих взаимодействий.

Среди трехмерных систем совместного культивирования одними из первых были разработаны клеточные сферы. Эндотелиоциты и гладкомышечные клетки высевали на дно культуральной посуды с антиадгезионным покрытием. Через 1–4 дня клетки формировали сферы на дне [71]. При этом гладкомышечные клетки оказывались в середине, а эндотелиоциты по периферии сферы и не образовывали тубулярные структуры. Сегодня используют «сэндвич» модель, где клетки разных типов зажаты между слоями Матригеля™, и эндотелиоциты формируют трубки, углубляющиеся в субстрат [72]. Такая модель наиболее точно воспроизводит финальную стадию ангиогенного ответа, поскольку *in vivo* гладкомышечные клетки и пероциты мигрируют к точке роста новой капиллярной ветви после формирования тубулярной структуры из эндотелиальных клеток.

### **2. Исследования сосудистых и тканевых эксплантатов *ex vivo***

Исследование ангиогенеза требует комплексной оценки неоваскуляризации как многостадийного формирования сосудистой стенки. В этой связи культивируемые ткани и органы *ex vivo* являются доступной и достоверной моделью для исследования всех этапов ангиогенеза. Исследуемый эксплантат подвергают воздействию тестируемых молекулярных агентов для анализа их ангиогенной активности. Оценка последней проводят, подсчитывая число и длину вновь образованных капилляров [73]. Наиболее распространенная *ex vivo* модель — кольцо аорты крысы. Преимуществом изучения органов *ex*

*in vivo* является стабильный кариотип и отсутствие пролиферации входящих в состав сосудистой стенки эндотелиоцитов. При работе с культурой клеток *in vitro* требуется нескольких пассажей для ликвидации спонтанной пролиферации клеток. Нужно отметить, что ангиогенез — это процесс, реализуемый, прежде всего, эндотелием микроциркуляторного русла, что следует учитывать при трактовке результатов, полученных при исследовании такого крупного сосуда, как аорта.

Помимо аорты крысы, распространенным объектом *ex vivo* является аорта куриного эмбриона. Тестирование про- или противоангиогенного вещества на такой модели быстро в исполнении (1–3 дня), может быть проведено в бессывороточной среде [74] и многократно воспроизведено в связи с доступностью модельного объекта. Оба метода могут быть дополнены использованием флуоресцеин-меченых лектинов (BSL-I, BSL-B4) или меченых антител к CD-31 для визуализации новообразованных капилляров.

### **3. Исследования *in vivo***

Несмотря на разнообразие разработанных тест-систем *in vitro*, ни одна из них не подходит для комплексной оценки ангиогенеза в силу отсутствия полного набора клеточных и молекулярных компонентов, а также невозможности полностью воссоздать тканевое микроокружение. Тесты *in vivo* на различных животных объектах не только широко используются для фундаментальных исследований ангиогенеза, но и являются неотъемлемой частью доклинических испытаний терапевтических агентов.

#### **3.1. Васкуляризация хориоаллантаоисной мембраны**

Изучение ангиогенеза на модели васкуляризации хориоаллантаоисной мембраны было впервые произведено более 100 лет назад и широко известно ввиду своей простоты, доступности и высокой воспроизводимости [75]. Хориоаллантаоисная мембрана имеет собственные (внезародышевые) сосуды, располагается под скорлупой яйца и оказывается доступной при ее разрушении в области воздушной камеры. На эту мембрану в стерильных условиях помещаются агенты, обладающие ангиогенной активностью. Таким образом была продемонстрирована способность опухолевых клеток стимулировать рост сосудов на мембране [76]. Оценка активности тестируемого агента является полуквантитативной, по шкале от 0 до 4, при этом анализируется формирование новых сосудов в мембране со всех сторон вокруг места аппликации [77].

Для наблюдения васкуляризации целой хориоаллантаоисной мембраны, а не только ее фрагмента под воздушной камерой, эмбрион вместе с зародышевыми оболочками переносят в культуральную посуду [78]. Через 3–6 дней инкубации вносят тестируемые агенты по всей площади мембраны. В этом случае исследование фактически проводится *in vitro*, однако объектом является «целый» организм, а новые сосуды формируются в нативном микроокружении. Эта техника *ex ovo* позволяет использовать большую площадь мембраны (возможна постановка нескольких тестов на одной модели), а также визуализировать васкуляризацию.

Преимуществами хориоаллантаической мембраны куриного эмбриона как тест-системы являются быстрота исполнения, доступность и дешевизна модельного объекта. Однако необходимо учитывать, что априорное наличие сосудов в хориоаллантаической мембране затрудняет оценку ангиогенеза и интерпретацию результатов. Кроме того, само по себе разрушение скорлупы стимулирует реактивный ангиогенез, что также необходимо учитывать при постановке эксперимента [7].

### 3.2. Васкуляризация роговицы

Роговица впервые была использована для изучения ангиогенеза в 1872 г. [79] и до сих пор остается распространенной экспериментальной моделью, поскольку не содержит собственных кровеносных сосудов. В первых экспериментах использовалась роговица кролика, впоследствии метод был адаптирован для крыс и мышей. Любое воздействие на роговицу стимулирует прорастание новых сосудов со стороны лимба, которые хорошо различимы в световой микроскоп. В этой связи было разработано множество методик индукции ангиогенеза: химическое раздражение роговицы, внутривитреальные инъекции, механическое повреждение лимбального эпителия, а также наиболее часто используемое прививание пористых имплантатов, медленно высвобождающих раствор с проангиогенным веществом [80]. Из роговицы впоследствии изготавливают гистологические препараты для микроскопической оценки площади васкуляризованной области, длины и диаметра образующихся сосудов [81].

Использование данной модели позволяет длительное наблюдение за динамикой ангиогенеза [82], а также количественную оценку неоваскуляризации, поскольку изначально роговица аваскуляризована. Однако сама по себе данная область нетипична для ангиогенеза в силу априорного отсутствия кровеносных сосудов. Кроме того, неоваскуляризация может являться следствием реактивного ангиогенеза роговицы вследствие нарушения ее целостности, а не воздействия ангиогенного агента, что необходимо учитывать при трактовке результатов.

### 3.3. Эмбрион *Danio rerio* как модель исследования ангиогенеза

Аквариумная рыба *Danio rerio* (zebrafish) является распространенным модельным объектом для исследований в области генетики и биологии развития, имея ряд преимуществ по сравнению с другими позвоночными животными. *Danio rerio* дает многочисленное потомство, эмбрионы развиваются быстро и характеризуются прозрачностью, облегчающей исследования ангиогенеза. *Danio rerio* имеет, помимо всего прочего, сходные с млекопитающими механизмы регуляции ангиогенеза, что делает этот организм особенно удобной экспериментальной моделью для исследования развития и функционирования сосудистой системы [83]. Так, известны и достаточно изучены стадии формирования межсегментных сосудов и подкишечных вен в ходе раннего эмбриогенеза [84], вследствие чего эта часть сосудистой системы *Danio rerio* стала объектом изучения влияния ингибиторов ангиогенеза [85]. Кроме того, для выяснения функции тех или иных факторов в регуляции ангиогенеза, осуществляют нокадаун генов с помощью

морфолино-модифицированных олигонуклеотидов, специфично ингибирующих трансляцию желаемых мРНК [86].

Чтобы визуализировать развивающуюся сосудистую сеть, предложено большое количество методик, в том числе инъекция красителя, специфически связывающегося с маркерами эндотелиоцитов, например, эндогенной щелочной фосфатазой [87], преимущественно экспрессирующейся эндотелиоцитами в ходе раннего эмбрионального развития. Однако этот метод используют только до 3 дня развития зародыша, и, кроме того, он требует фиксации ткани. Для визуализации сосудистой сети живого объекта применяют методы конфокальной микроскопии [88]. При этом флуоресцирующие микросферы (0,02 мкм в диаметре) инъецируют внутрь сосудов эмбриона, после чего вся сосудистая сеть визуализируется при помощи конфокального микроскопа [89]. К сожалению, ранние этапы васкулогенеза и ангиогенеза, когда просвет растущего сосуда еще не установлен, наблюдать в этом случае невозможно.

Были созданы трансгенные *Danio rerio*, экспрессирующие GFP под контролем промотора гена молекулярного фактора, маркирующего эндотелиоциты: Fli-eGFP (GFP ассоциирован с транскрипционным фактором Fli-1) [85], mTie2-GFP (GFP ассоциирован с мембранным рецептором ангиотензина-1 Tie-2) [90], Flk-GFP (GFP ассоциирован с Flk-1, рецептором фактора роста эндотелия сосудов VEGF) [91]. Кроме того, трансгенная *Danio rerio* со специфически мечеными эритроцитами с помощью красного флуоресцентного маркера dsRED (GATA1-dsRED) была скрещена с линией Fli-eGFP для создания дважды трансгенного организма, где кровеносные сосуды окрашиваются зеленым, а эритроциты красным цветом, что позволяет создать модель движения крови по сосудам [92].

Опухолевый ангиогенез также можно наблюдать с помощью трансгенных *Danio rerio* Fli-eGFP с помощью инъекции флуоресцентно меченых опухолевых клеток рядом с развивающимся сосудом: в желточный мешок, желудочек мозга или внутрь крупного сосуда [93, 94]. Во всех случаях наблюдается развитие опухоли и индукция ангиогенеза, что можно визуализировать с помощью конфокального микроскопа. Однако сомнительным остается достоверность результатов и целесообразность наблюдения за ангиогенезом, стимулируемым ксенотрансплантатами опухоли человека внутри организма рыбы.

### 3.4. Имплантация полимерных материалов

Имплантация животным различных материалов с целью индукции реактивного ангиогенеза широко использовалась в исследовательской практике с начала второй половины прошлого века [95–97]. Модельными объектами чаще всего являются собаки, крысы, кролики. Имплантат представляет собой ячеистый или губчатый материал, который содержит ангиогенный агент, индуцирующий рост сосудов со стороны тканей организма внутри имплантата. В качестве субстратов в разное время использовались ячеистые стальные камеры [98], синтетические губчатые матриксы (полиэстер, полиуритан) [99], а также Матригель™ [100]. Субстрат, содержащий тестируемое вещество или клетки, имплантируется подкожно, обеспечивая медленное высвобождение агента, и может находиться в организме животного



от нескольких дней до нескольких недель [101].

**Имплантация Матригеля™ *in vivo*.** Матригель™ наиболее достоверно имитирует естественное тканевое микроокружение в силу своего природного происхождения. Он состоит из компонентов базальной мембраны, полученной из опухоли Энгельбрет-Хольм-Сворма, имеет жидкое состояние при температуре 4°C и полимеризуется при 37°C [102]. При подкожной инъекции Матригеля™, смешанного с ангиогенными факторами, он полимеризуется с образованием плотной пористой структуры, внутрь которой мигрируют эндотелиоциты, формирующие сосуды. Интенсивность ангиогенеза оценивают после удаления Матригеля и его гистологического окрашивания. Недостатком использования Матригеля™ в качестве тест-системы является наличие в его составе ростовых факторов и цитокинов, способных индуцировать ангиогенез и, таким образом, искажать результат эксперимента. Для минимизации этого эффекта был создан Матригель™ со сниженным содержанием ростовых факторов.

**Имплантация губчатых полимерных материалов различной природы.** Со времени первых экспериментов по имплантации различных материалов подкожно модельным животным эта методика применялась для изучения неоваскуляризации сосудисто-волокнистой ткани и механизма заживления ран [103], метаболизма коллагена [104], динамики клеточной пролиферации [105], развития грануляционной ткани [106], проникновения нейтрофилов и макрофагов в область имплантата [107, 108], а также тестирования противовоспалительных агентов [109]. Метод также используется для воспроизведения опухолевого ангиогенеза путем введения материала, содержащего опухолевые клетки [110, 111], с последующим анализом влияния различных тестируемых агентов на прорастание сосудов внутри имплантата.

В лабораториях используются десятки различных материалов, такие как поливинилалкоголь (ПВА), ацетат целлюлозы, полиэстер, полиэфир, полиуретан и др., а также их различные комбинации. Для оценки неоваскуляризации анализируют изменения потока крови с помощью инъекции  $^{133}\text{Xe}$  в область имплантата и высчитывания скорости его клиренса [112]. Во избежание работы с радиоактивными материалами для этих целей используют красители на основе флуоресцеина [113]. Впоследствии имплантат удаляют и анализируют иммуногистохимически на экспрессию CD31, ICAM-2 и других маркеров эндотелиоцитов [114, 115]. Также можно оценить количество гемоглобина в имплантате, которое, впрочем, сильно зависит от размера вновь образованных сосудов и от их проницаемости [113].

Недостаток данного метода связан с невозможностью постоянного наблюдения за динамикой неоваскуляризации. Кроме того, подкожное внедрение материала само по себе активирует реактивный ангиогенез, ввиду чего прорастание сосудов в область имплантата стимулируется как действием содержащегося проангиогенного агента, так и хирургическим вмешательством.

### 3.5. Модели опухолевого ангиогенеза *in vivo*

Впервые концепция ангиогенеза как важнейшего компонента роста опухоли и метастазирования была сформулирована в работах J. Folkman (1971) [116]. В рамках этой концепции ангиогенез исследуется на

молекулярном и клеточном уровнях для определения молекулярных мишеней и выработки избирательных подходов к ингибированию различных звеньев ангиогенеза. Таким образом, модели опухолевого ангиогенеза должны позволять тестировать ангиостатические, а не ангиостимуляторные агенты для создания новых терапевтических стратегий лечения злокачественных новообразований.

**Подкожная имплантация опухолевых клеток.** Широко распространенным способом исследования опухолевого роста и ангиогенеза является подкожное введение опухолевых клеток [117–119]. Они формируют опухоль, которая по мере увеличения в размерах, стимулирует прорастание кровеносных сосудов. В данном случае опухоль локализуется не в свойственной ей области, поэтому положительный результат, полученный при работе с такой тест-системой, впоследствии проверяют на модели, в которой опухолевые клетки имплантируются ортотопически. Динамику роста сосудов в этом случае невозможно визуализировать и наблюдать во времени. Однако, в случае если группа исследуемых животных большая, ее делят на несколько подгрупп, удаляя опухоли для гистологического исследования у разных подгрупп через равные промежутки времени [120].

**Ортотопическая имплантация опухолевых клеток.** Опухоли различной природы неодинаково реагируют на воздействие антиангиогенных агентов [121]. Таким образом, появилось большое количество ортотопических опухолевых моделей *in vivo* для большинства видов опухолей человека. В отличие от подкожного введения, ортотопическое является технически более сложным, мониторинг роста опухоли часто затруднен. Для ликвидации этих недостатков используют трансфицированные опухолевые клетки, экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок GFP. Это позволяет осуществлять мониторинг роста опухоли и метастазирования с помощью конфокальной микроскопии [122]. Таким способом оценивают влияние ангиостатических веществ на динамику опухолевого ангиогенеза во времени.

Также имеются линии трансгенных мышей, экспрессирующих GFP под контролем эндотелиальной NO-синтазы либо рецептора Tie-2, маркеров эндотелиальных клеток [123, 124]. Таким образом, все сосуды животного экспрессируют GFP, что позволяет визуализировать опухолевый ангиогенез в рамках ортотопической модели. Однако экспрессия обоих маркеров регулируется внешними факторами, такими как кровяное давление или рост опухоли, от чего их содержание на поверхности эндотелиоцитов может варьировать [125, 126]. Кроме того, в 1997 г. научной группой M. Okabe (1997) была создана линия трансгенных мышей, все клетки которой экспрессируют GFP («зеленая» мышь) [127]. Такие мыши были скрещены с nude-мышью для получения иммунодефицитной линии с зеленой флуоресценцией всех тканей и органов [128]. Имплантация опухолевых клеток, меченных красным флуоресцентным белком RFP, в организм таких мышей позволяет получать двцветные иллюстрации всех стадий канцерогенеза и опухолевого ангиогенеза, а также выявлять паттерны взаимодействия опухоли с организмом реципиента [129].

**Трансгенные модели животных.** Описанные выше модели не позволяют исследовать самые ранние стадии канцерогенеза в связи с использованием

опухолевых клеток человека, которые уже характеризуются атипичностью на момент имплантации в организм животного. В течение последних 20 лет были созданы линии трансгенных животных, сверхэкспрессирующих определенные онкогены, что ведет к спонтанному появлению первичных опухолей. Так, мыши RIP-Tag, с сверхэкспрессией SV40-Tag онкогена под контролем регуляторного элемента инсулина, являются моделью опухоли  $\beta$ -клеточных островков поджелудочной железы. В течение жизни мыши опухоль проходит все стадии канцерогенеза от небольшого количества областей гиперплазии до агрессивного метастазирования. [130, 131]. Достоинство таких моделей заключается в возможности анализа активности тестируемого антиангиогенного вещества на разных стадиях ангиогенеза и канцерогенеза, начиная с самой ранней. В рамках данных тест-систем оценивают: степень некроза и морфологию опухоли (окраска гематоксино-эозином) [132], формирование тромбозов (MSB окраска на фибрин) [132], количество вновь образованных капилляров (окраска CD31/CD34) [133], активность пролиферирующих клеток (анализ экспрессии PCNA) [134], степень апоптоза (TUNEL-тест) [134]. Все эти исследования требуют временных и финансовых затрат, однако именно такие модельные системы позволяют оценить патологическую неоваскуляризацию в микроокружении, характерном для данного вида опухоли.

### Заключение

Интенсивная разработка новых экспериментальных тест-систем для исследования ангиогенеза является следствием растущего интереса к неоваскуляризации как компоненту патогенеза различных заболеваний. Это обуславливает необходимость поиска подходящей модели как для фундаментальных исследований механизмов ангиогенеза, так и для доклинической оценки ангиогенной активности разрабатываемых терапевтических агентов. Однако многие из этих агентов после успешных доклинических тестов *in vitro* и *in vivo* не демонстрируют таких же обнадеживающих результатов при проведении кли-

нических исследований [5]. Такое несоответствие результатов доклинического и клинического этапов выявляет несовершенство *in vitro* и *in vivo* тестов, а также необходимость их возможной модификации и дальнейшей разработки. Так, *in vitro* методы являются быстрыми и высоко воспроизводимыми и часто используются с целью нахождения клеточных мишеней для разработки терапевтической стратегии. Однако кариотип, фенотип, а также характер реакции эндотелиоцитов в культуре на воздействие стимула значительно отличаются от таковых у эндотелиоцитов, находящихся в естественном микроокружении, что необходимо учитывать при интерпретации результатов. Культивирование фрагментов крупных сосудов *ex vivo* (аорты крысы и др.), служащее «связующим звеном» между *in vitro* и *in vivo*, строго говоря, не считается подходящей моделью для изучения ангиогенеза, поскольку последний разворачивается в рамках микроциркуляторного звена сосудистой сети. Наконец, результаты различных тестов *in vivo* отличаются между собой в зависимости от вида модельного объекта (*Danio rerio*, мышь, эмбрион курицы и т.д.), особенностей микроокружения исследуемых областей (роговица и хориоаллантаоисная мембрана) и индивидуальной реакции организма на вводимый агент. Таким образом, идеальная экспериментальная модель для ангиогенеза все еще не разработана, поэтому постановка нескольких *in vitro* и *in vivo* тестов является обязательной для получения достоверных результатов при оценке ангиогенной активности агента либо выполнении фундаментального исследования.

### =Благодарности

Работа финансировалась грантом Российского Научного Фонда 14-15-00916. Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета и за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности.

### ЛИТЕРАТУРА:

1. Carmeliet P., Jain R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011; 473(7347): 298-307.
2. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 2000; 6(4): 389-95.
3. Jain R.K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005; 307(5706): 58-62.
4. Куприянов В.В., Миронов В.А., Миронов А.А. и др. Ангиогенез. М.: Квартет; 1993.
5. Staton C.A., Reed M.W., Brown N.J. A critical analysis of current *in vitro* and *in vivo* angiogenesis assays. *Int. J. Exp. Pathol.* 2009; 90(3): 195-221.
6. Шевченко Н.А. Эмбриональный гистогенез эндотелия. *Архив анатомии* 1981; 81(2): 5-18.
7. Eccles S.A., Court W., Patterson L. et al. *In vitro* assays for cell functions related to angiogenesis: Proliferation, motility, tubular differentiation and proteolysis. In: Marim S., Murray C., editors. *Angiogenesis Protocols*. 2nd ed. Nottingham: Humana Press; 2009. p. 159-82.
8. Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G. et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins, identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 1973; 52: 2745-56.
9. Staton C.A., Stribbling S.M., Tazzyman S. et al. Current methods for assaying angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Exp. Pathol.* 2004; 85(5): 233-48.
10. Салафутдинов И.И., Шафигуллина А.К., Ялвач М.Э. и др. Эффект одновременной экспрессии различных изоформ фактора роста эндотелия сосудов VEGF и основного фактора роста фибробластов FGF2 на пролиферацию эндотелиальных клеток пупочной

вены человека HUVEC. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2010; V(2): 62-7.

11. Boufs D., Hospers G.A., Meijer C. et al. Endothelium *in vitro*: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis* 2001; 4(2): 91-102.
12. Benndorf R., Boger R.H., Ergun S. et al. Angiotensin II type 2 receptor inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration and *in vitro* tube formation of human endothelial cells. *Circ. Res.* 2003; 93: 438-47.
13. Ma X., Wehland M., Schulz H. et al. Genomic approach to identify factors that drive the formation of three-dimensional structures by EA.hy926 endothelial cells. *PLoS One* 2013; 8(5): e64402.
14. Salahuddin S.Z., Nakamura S., Biberfeld P. et al. Angiogenic properties of Kaposi's sarcoma-derived cells after long-term culture *in vitro*. *Science* 1988; 242: 430-3.
15. Muruganandam A., Herx L.M., Monette R. et al. Development of immortalized human cerebrovascular endothelial cell line as an *in vitro* model of the human blood-brain barrier. *FASEB J.* 1997; 11(13): 1187-97.
16. Michael A., Gimbrone J., Fareed G.C. Transformation of cultured human vascular endothelium by SV40 DNA. *Cell* 1976; 9(2): 685-93.
17. Ide H., Minamishima Y., Ezuru Y. et al. 'Transformation' of human endothelial cells by SV40 virions. *Microbiol. Immunol.* 1988; 32(1): 45-55.
18. Iijima S., Ishida M., Nakajima-Iijima S. Immortalization of human endothelial cells by origin-defective simian virus 40 DNA. *Agric. Biol. Chem.* 1991; 55(11): 2847-53.

19. Fickling S.A., Tooze J.A., Whitley G.S.J. Characterization of human umbilical vein cell lines produced by transfection with the early region of SV40. *Exp. Cell Res.* 1992; 201: 517-21.
20. Hohenwarter O., Zinser E., Schmatz C. et al. Influence of transfected SV40 early region on growth and differentiation of human endothelial cells. *J. Biotechnol.* 1992; 25: 349-56.
21. Hohenwarter O., Schmatz C., Katinger H. Stability of von Willebrand factor secretion in divergent human endothelial hybrid cell lines. *Cytotechnology* 1992; 8: 31-7.
22. Lassalle P., LaGrou C., Delneste Y. et al. Human endothelial cells transfected by SV 40 T antigens: Characterization and potential use as a source of normal endothelial factors. *Eur. J. Immunol.* 1992; 22: 425-31.
23. Hohenwarter O., Jakoubek A., Schmatz C. et al. Expression of SV40 tumor antigens enables human endothelial cells to grow independently from fetal calf serum and exogenous growth factors. *J. Biotechnol.* 1994; 34: 205-11.
24. Schütz M., Teifel M., Friedl P. Establishment of a human placental endothelial cell line with extended life span after transfection with SV 40 T-antigens. *Eur. J. Cell Biol.* 1997; 74(4): 315-20.
25. Werner S., Hofschneider P.H., Stürzl M. et al. Cytochemical and molecular properties of simian virus 40 transformed Kaposi's sarcoma-derived cells: Evidence for the secretion of a member of the fibroblast growth factor family. *J. Cell Physiol.* 1989; 141: 490-502.
26. Corbeil J., Evans L.A., Vasak E. et al. Culture and properties of cells derived from Kaposi sarcoma. *J. Immunol.* 1991; 146(9): 2972-76.
27. Edgell C.J.S., McDonald C.C., Graham J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *PNAS USA* 1983; 80: 3734-7.
28. Faller D.V., Kourembanas S., Ginsberg D. et al. Immortalization of human endothelial cells by murine sarcoma viruses, without morphologic transformation. *J. Cell Physiol.* 1988; 134: 47-56.
29. Schwartz B., Vicart P., Delouis C. et al. Mammalian cell lines can be efficiently established in vitro upon expression of the SV40 large T antigen driven by a promoter sequence derived from the human vimentin gene. *Biol. Cell* 1991; 73: 7-14.
30. Sasaguri Y., Yanagi H., Nagase H. et al. Collagenase production by immortalized human aortic endothelial cells infected with simian virus 40. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 1991; 60(2): 91-7.
31. Cockerill G.W., Meyer G., Noack L. et al. Characterization of a spontaneously transformed human endothelial cell line. *Lab. Invest.* 1994; 71(4): 497-509.
32. Fontijn R., Hop C., Brinkman H.J. Maintenance of vascular endothelial cell-specific properties after immortalization with an amphotropic replication-deficient retrovirus containing human papilloma virus 16 e5/e7 DNA. *Exp. Cell Res.* 1995; 216: 199-207.
33. Moldovan F., Soliman H.R., Bannani H. et al. Functional properties of a new line of immortalized human endothelial cells. *C. R. Acad. Sci. III* 1995; 318: 951-8.
34. Le Tonquèze M., Jamin C., Böhme M. et al. Establishment and characterization of permanent human endothelial cell clones. *Lupus* 1996; 5: 103-12.
35. Leeuwen van E.B., Veenstra R., Wijk van R. et al. Characterization of immortalized human umbilical and iliac vein endothelial cell lines after transfection with SV40 large T-antigen. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 2000; 11(1): 15-25.
36. Yang J., Chang E., Cherry A.M. Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(37): 26141-8.
37. Ades E.W., Candal F.J., Swerlick R.A. et al. HMEC-1: Establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J. Invest. Dermatol.* 1992; 99: 683-90.
38. Hering S., Grin B.E., Strauss M. Immortalization of human fetal sinusoidal liver cells by polyoma virus large T antigen. *Exp. Cell Res.* 1991; 195: 1-7.
39. Candal F.J., Rafii S., Parker J.T. BMEC-1: A human bone marrow microvascular endothelial cell line with primary cell characteristics. *Microvasc. Res.* 1996; 52: 221-34.
40. Schweitzer K.M., Vicart P., Delouis C. Characterization of a newly established human bone marrow endothelial cell line: Distinct adhesive properties for hematopoietic progenitors compared with human umbilical vein endothelial cells. *Lab. Invest.* 1997; 76(1): 25-36.
41. Lehr J.E., Pienta K.J. Preferential adhesion of prostate cancer cells to a human bone marrow endothelial cell line. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998; 90(2): 118-23.
42. Heffelfinger S.C., Hawkins H.H., Barrish J. SK HEP-1: A human cell line of endothelial origin. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 1992; 28A: 136-42.
43. Hoover M.L., Vevica V., Hopaur J.M. et al. Human endothelial cell line from an angiosarcoma. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 1993; 29A: 199-202.
44. Бенюмович М.С. Счетная камера с сетками Горяева. Патент РФ на изобр. №212630. 20 февраля 1999.
45. Denizot F., Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 1986; 89: 271-7.
46. Wemme H., Pfeifer S., Heck R. et al. Measurement of lymphocyte proliferation: critical analysis of radioactive and photometric methods. *Immunobiology* 1992; 185: 78-89.
47. Wilson G.D. Measurement of cell kinetics in human tumours in vivo using bromodeoxyuridine incorporation and flow cytometry. *Br. J. Cancer* 1988; 58(4): 423-31.
48. Lyons A.B. Analyzing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J. Immunol. Methods* 2000; 243(12): 147-54.
49. Lyons A.B., Parish. C.R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 1994; 171: 131-213.
50. Neckers L.M., Funkhouser W.K., Trepel J.B. et al. Significant non-s-phase DNA synthesis visualized by flow cytometry in activated and in malignant human lymphoid cells. *Exp. Cell Res.* 1995; 156: 429-38.
51. Bullwinkel J., Baron-Lühr B., Lüdemann A. et al. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J. Cell Physiol.* 2006; 206(3): 624-35.
52. Gomez D., Reich N.C. Stimulation of primary human endothelial cell proliferation by IFN. *J. Immunol.* 2003; 170: 5373-81.
53. Schor A.M., Ellis I., Schor S.L. Chemotaxis and chemokinesis in 3D macromolecular matrices. *Methods Mol. Med.* 2001; 46: 163-83.
54. Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* 1962; 115: 453-66.
55. Alessandri G., Raju F., Gullino P.M. Mobilization of capillary endothelium in vitro induced by effectors of angiogenesis in vivo. *Cancer Res.* 1983; 43: 1790-7.
56. Smith J.T., Tomfohr J.K., Wells M.C. Measurement of cell migration on surface-bound fibronectin gradients. *Langmuir* 2004; 20: 8279-86.
57. Albini A., Benelli R., Noonan D.M. et al. The "chemoinvasion assay": a tool to study tumor and endothelial cell invasion of basement membranes. *Int. J. Dev. Biol.* 2004; 48: 563-71.
58. Wong M.K., Gotlieb A.I. In vitro re-endothelialization of a single-cell wound. Role of microfilament bundles in rapid lamellipodia-mediated wound closure. *Lab. Invest.* 1984; 51: 75-81.
59. Pepper M.S., Belin D., Montesano R. et al. Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. *J. Cell Biol.* 1990; 111: 743-55.
60. Lampugnani M.G. Cell migration into a wounded area in vitro. *Methods Mol. Biol.* 1999; 96: 177-82.
61. Auerbach R., Auerbach W., Polakowski I. Assays for angiogenesis: a review. *Pharmacol. Ther.* 1991; 51: 1-11.
62. Cai G., Lian J., Shapiro S.S. et al. Evaluation of endothelial cell migration with a novel in vitro assay system. *Methods Cell Sci.* 2000; 22: 107-14.
63. Folkman J., Haudenschild C. Angiogenesis in vitro. *Nature* 1980; 288(5791): 551-6.
64. Auerbach R., Lewis R., Shinnors B. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin. Chem.* 2003; 49: 32-40.
65. Lawley T.J., Kubota Y. Induction of morphologic differentiation of endothelial cells in culture. *J. Invest. Dermatol.* 1989; 93: 59-61.
66. Kanzawa S., Endo H., Shioya N. Improved in vitro angiogenesis model by collagen density reduction and the use of type III collagen. *Ann. Plast. Surg.* 1993; 30: 244-51.
67. Madri J.A., Williams S.K. Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components. *J. Cell Biol.* 1983; 97: 153-65.
68. Peters E.B., Christoforou N., Leong K.W. et al. Comparison of mixed and lamellar coculture spatial arrangements for tissue engineering capillary networks in vitro. *Tissue Eng. Part A* 2013; 19(5-6): 697-706.
69. Rizvanov A.A., Yalvaç M.E., Shafigullina A.K. et al. Interaction and self-organization of human mesenchymal stem cells and neuroblastoma SH-SY5Y cells under co-culture conditions: a novel system for modeling cancer cell micro-environment. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2010; 76(2): 253-9.
70. Hirschi K.K., Rohovsky S.A., D'Amore P.A. PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J. Cell Biol.* 1998; 141(3): 805-14.
71. Korff T., Kimmina S., Martiny-Baron G. et al. Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB J.* 2001; 15(2): 447-57.
72. Darland D.C., Massingham L.J., Smith S.R. Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev. Biol.* 2003; 264(1): 275-88.

73. Nicosia R.F., Lin Y.J., Hazelton D. et al. Endogenous regulation of angiogenesis in the rat aorta model. Role of vascular endothelial growth factor. *Am. J. Pathol.* 1997; 151: 1379-86.
74. Muthukaruppan V.R., Shinnars B.L., Lewis R. et al. The chick embryo aortic arch assay: a new, rapid, quantifiable in vitro method for testing the efficacy of angiogenic and anti-angiogenic factors in a three-dimensional, serum-free organ culture system. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 2000; 41: 65.
75. Murphy J.B. Transplantability of tissues to the embryo of foreign species. Its bearing on questions of tissue specificity and tumor immunity. *J. Exp. Med.* 1913; 17: 482-93.
76. Ausprunk D.H., Knighton D.R., Folkman J. Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois. Role of host and preexisting graft blood vessels. *Am. J. Pathol.* 1975; 79(3): 597-618.
77. Weiss J. B., Elstow S. F., Hill C. R. et al. Low molecular weight angiogenesis factor: a growth factor not unique to tumours which activates procollagenase. *Prog. Appl. Microcirc.* 1984; 4: 76-87.
78. Zijlstra A., Seandel M., Kupriyanova T.A. et al. Proangiogenic role of neutrophil-like inflammatory heterophils during neovascularization induced by growth factors and human tumor cells. *Blood* 2006; 107: 317-27.
79. Arnold J. Experimentelle Untersuchungen ueber die Blutkapillaren Virchows Arch. *Pathol. Anat.* 1872; 53: 70-92.
80. Shan S., Dewhirst M. W. Corneal angiogenesis assay. In: Staton C.A., Lewis C., Bicknell R., editors. *Angiogenesis Assays: A Critical Appraisal of Current Techniques.* New York: John Wiley & Sons; 2006. p. 203-222.
81. Ziche M., Morbidelli L. The corneal pocket assay. *Methods Mol. Biol.* 2015; 1214: 15-28.
82. Falkvoll K.H. A method to quantify neovascularization in the mouse cornea. *Ophthalmic Res.* 1991; 23(2): 104-14.
83. Tobia C., Gariano G., De Sena G. et al. Zebrafish embryo as a tool to study tumor/endothelial cell cross-talk. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 2013; 1832(9): 1371-7.
84. Isogai S., Horiguchi M., Weinstein B.M. The vascular anatomy of the developing zebrafish: an atlas of embryonic and early larval development. *Dev. Biol.* 2001; 230: 278-301.
85. Lawson N.D., Weinstein B.M. Arteries and veins: making a difference with zebrafish. *Nat. Rev. Genet.* 2002; 3: 674-82.
86. Currie P.D., Ingham P.W. Induction of a specific muscle cell type by a hedgehog-like protein in zebrafish. *Nature* 1996; 382: 452-5.
87. Serbedzija G.N., Flynn E., Willett C.E. Zebrafish angiogenesis: a new model for drug screening. *Angiogenesis* 1999; 3(4): 353-9.
88. Weinstein B.M., Stemple D.L., Driever W. et al. Gridlock, a localized heritable vascular patterning defect in the zebrafish. *Nat. Med.* 1995; 1: 1143-7.
89. Chico T.J., Ingham P.W., Crossman D.C. Modeling cardiovascular disease in the zebrafish. *Trends Cardiovasc. Med.* 2008; 18: 150-5.
90. Motoike T., Loughna S., Perens E. et al. Universal GFP reporter for the study of vascular development. *Genesis* 2000; 28: 75-81.
91. Cross L.M., Cook M.A., Lin S. et al. Rapid analysis of angiogenesis drugs in a live fluorescent zebrafish assay. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23: 911-22.
92. Gray C., Packham I.M., Wurmser F. et al. Ischemia is not required for arteriogenesis in zebrafish embryos. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27: 2135-41.
93. Haldi M., Ton C., Seng W.L. et al. Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish. *Angiogenesis* 2006; 9: 136-51.
94. Stoletov K., Montel V., Lester R.D. High resolution imaging of the dynamic tumour cellvascular interface in transparent zebrafish. *PNAS USA* 2007; 104: 17406-11.
95. Grindlay J. H., Waugh J.M. Plastic sponge which acts as a framework for living tissue; experimental studies and preliminary report of use to reinforce abdominal aneurysms experimental studies and preliminary report of use to reinforce abdominal aneurysms. *AMA Arch. Surg.* 1951; 63: 288-97.
96. Woessner J.F., Boucek R. J. Enzyme activities of rat connective tissue obtained from subcutaneously implanted polyvinyl sponge. *J. Biol. Chem.* 1959; 234: 3296-300.
97. Edwards R.H., Sarmenta S.S., Hass G.M. Stimulation of granulation tissue growth by tissue extracts; study by intramuscular wounds in rabbits. *Arch. Pathol.* 1960; 69: 286-302.
98. Schilling J.A., Joel W., Shurley H.M. Wound healing: a comparative study of the histochemical changes in granulation tissue contained stainless steel wire mesh and polyvinyl cylinders. *Surgery* 1959; 46: 702-10.
99. Andrade S.P., Ferreira M.A. The sponge implant model of angiogenesis. *Methods Mol. Biol.* 2009; 467: 295-304.
100. Kleinman H.K., Graf J. et al. Role of basement membranes in cell differentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1987; 513: 134-45.
101. Passaniti A., Taylor R.M., Pili R. et al. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin and fibroblast growth factor. *Lab. Invest.* 1992; 67: 519-28.
102. Kleinman H.K., McGarvy M.L., Liotta L.A. et al. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 1982; 24: 6188-93.
103. Edwards R.H., Sarmenta S.S., Hass G.M. Stimulation of granulation tissue growth by tissue extracts; study by intramuscular wounds in rabbits. *Arch. Pathol.* 1960; 69: 286-302.
104. Paulini K., Korner B., Beneke G. et al. A quantitative study of the growth of connective tissue: investigations on polyester-polyurethane sponges. *Connect. Tissue Res.* 1974; 2: 257-64.
105. Davidson J.M., Klagsbrun M., Hill K.E. et al. Accelerated wound repair, cell proliferation and collagen accumulation are produced by a cartilage-derived growth factor. *J. Cell. Biol.* 1985; 100: 1219-27.
106. Holund B., Junker P., Garbarsch C. et al. Formation of granulation tissue in subcutaneously implanted sponges in rats. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1979; 87: 367-74.
107. Belo A.V., Barcelos L.S., Teixeira M.M. et al. Differential effects of antiangiogenic compounds in neovascularization, leukocyte recruitment, VEGF production, and tumour growth in mice. *Cancer Invest.* 2004; 22: 723-9.
108. Ferreira M.A., Barcelos L.S., Campos P.P. et al. Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFR-KO). *Br. J. Pharmacol.* 2004; 141: 1185-92.
109. Ford-Hutchinson A.W., Walker J.A., Smith J.A. Assessment of anti-inflammatory activity by sponge implantation techniques. *J. Pharmacol. Meth.* 1977; 1: 3-7.
110. Mahadevan V., Hart I.R., Lewis G.P. Factors influencing blood supply in wound granuloma quantitated by a new in vivo technique. *Cancer Res.* 1989; 49: 415-9.
111. Lage A.P., Andrade S.P. Assessment of angiogenesis and tumor growth in conscious mice by a fluorimetric method. *Microvasc. Res.* 2000; 59: 278-85.
112. Andrade S.P., Fan T.-P.D., Lewis G.P. Quantitative in vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. *Br. J. Exp. Path.* 1987; 68: 755-66.
113. Andrade S.P., Ferreira M.A. The sponge implant model of angiogenesis. *Methods Mol. Biol.* 2009; 467: 295-304.
114. Solowiej A., Biswas P., Graesser D. et al. Lack of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 attenuates foreign body inflammation because of decreased angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 2003; 162: 953-62.
115. Baker J.H.E., Huxham L.A., Kyle A.H. et al. Vascular-specific quantification in an in vivo Matrigel chamber angiogenesis assay. *Microvasc. Res.* 2006; 71: 69-75.
116. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 1971; 285(21): 1182-6.
117. Gou M.L., Men K., Shi H. et al. Curcumin-loaded biodegradable polymeric micelles for colon cancer therapy in vitro and in vivo. *Nanoscale* 2011; 3(4): 1558-67.
118. Stribbling S.M., Friedlos F., Martin J. et al. Regressions of established breast carcinoma xenografts by carboxypeptidase G2 suicide gene therapy and the produrg CMDA are due to a bystander effect. *Hum. Gene Ther.* 2000; 11: 285-92.
119. Brown N.J., Staton C.A., Rodgers G.R. et al. Fibrinogen E fragment selectively disrupts the vasculature and inhibits the growth of tumours in a syngeneic murine model. *Br. J. Cancer* 2002; 86: 1813-6.
120. Bruns C.J., Harbison M.T., Davis D.W. et al. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6(5): 1936-48.
121. Jung Y.D., Ahmad S.A., Liu W. et al. The role of the microenvironment and intercellular cross-talk in tumour angiogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 2002; 12: 105-12.
122. Cross N.A., Fowles A., Reeves K. et al. Imaging the effects of castration on bone turnover and hormone dependent prostate cancer colonization of bone. *Prostate* 2008; 68: 1707-14.
123. Van Haperen R., Cheng C., Mees B.M.E. et al. Functional expression of endothelial nitric oxide synthase fused to green fluorescent protein in transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 2003; 163: 1677-86.
124. Hillen F., Kaijzel E.L., Castermans K. et al. A transgenic Tie2-GFP athymic mouse model; a tool for vascular biology in xenograft tumours. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 368: 364-7.
125. Cheng C., van Haperen R., de Waard M. et al. Shear stress affects the intracellular distribution of eNOS: direct demonstration by a novel in vivo technique. *Blood* 2005; 106: 3691-8.

126. Martin V., Liu D., Fueyo J., Gomez-Manzano C. Tie2: a journey from normal angiogenesis to cancer and beyond. *Histol. Histopathol.* 2008; 23: 773-80.
127. Okabe M., Ikawa M., Kominami K. et al. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 1997; 407: 313-9.
128. Yang M., Reynoso J., Jiang P. et al. Transgenic nude mouse with ubiquitous green fluorescent protein expression as a host for human tumors. *Cancer Res.* 2004; 64: 8651-6.
129. Yang M., Li L., Jiang P. et al. Dual-color fluorescence imaging distinguishes tumor cells from induced host angiogenic vessels and stromal cells. *PNAS USA* 2003; 100: 14259-62.
130. Hanahan D., Christofori G., Naik P. et al. Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *Eur. J. Cancer* 1996; 32A: 2386-93.
131. Åkerblom B., Zang G., Zhuang Z.W. Heterogeneity among RIP-Tag insulinomas allow vascular endothelial growth factor A independent tumor expansion as revealed by studies in Shb mutant mice: implications for tumor angiogenesis. *Mol. Oncol.* 2012; 6(3): 333-46.
132. Staton C.A., Reed M.W., Brown N.J. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int. J. Exp. Pathol.* 2009; 90(3): 195-221.
133. Staton C.A., Stribbling S.M., Garcia-Echeverria C. et al. Identification of key residues involved in mediating the in vivo anti-tumour/anti-endothelial activity of Alphastatin. *J. Thromb. Haemost.* 2007; 5: 846-54.
134. Inoue K., Chikazawa M., Fukata S. Docetaxel enhances the therapeutic effect of the angiogenesis inhibitor TNP-470 (AGM-1470) in metastatic human transitional cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9: 886-99.

*Поступила: 05.03.2015*