

БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ АНГИОГЕНЕЗА

© Н.А. Верлов¹, А.П. Трашков², М.А. Пахомова³, Н.В. Хайцев³, Е.И. Малышев¹

¹Санкт-Петербургский национальный исследовательский академический университет;

²Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова;

³ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России

Поступила в редакцию: 20.02.2016

Принята к печати: 14.04.2016

Резюме. Успехи или неудачи исследователей в различных областях биологии и медицины обусловлены существованием или отсутствием моделей тех или иных физиологических или патологических процессов, удобных в использовании и адекватных клиническим проявлениям, которые бы обладали при этом достаточной предиктивной способностью. Несмотря на значительное разнообразие моделей, применяемых в современной ангиологии, ни одна не является «золотым стандартом» и не может служить эталоном и отправной точкой при разработке новых методов лечения, направленных на кровеносные сосуды. Необходимость использования различных моделей в исследовании каждого из этапов ангиогенеза составляет одну из главных трудностей при формировании универсальной картины протекания ангиогенеза у людей и животных. Концепция ингибирования роста злокачественных новообразований путем блокирования факторов — индукторов ангиогенеза, рецепторов к ним или прямого разрушения стенки микрососудов послужила отправной точкой для углубленного исследования ангиогенеза на различных моделях *in vitro* и *in vivo*. Широкий спектр применяемых моделей онкогенеза позволяет изучить его с различных сторон, выявить общие закономерности опухолевого процесса, механизмы взаимодействия новообразований с различными тканями и органами, в том числе и системой кровообращения. Исследования на трансгенных животных позволили установить ключевую роль ангиогенеза в развитии организма, а также получить результаты, максимально близкие к эффектам, наблюдаемым при изучении различных аспектов ангиогенеза у человека.

Ключевые слова: ангиогенез; биомоделирование; опухоль; клеточные технологии.

BIOMODELLING ANGIOGENESIS

© N.A. Verlov¹, A.P. Trashkov², M.A. Pahomova³, N.V. Haitsev³, E.I. Malyshev¹

¹St Petersburg National Research Academic University, Russia;

²Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry named after I.M. Sechenov, Russia;

³Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Russia

For citation: Pediatrician (St. Petersburg), 2016;7(2):127-134

Received: 20.02.2016

Accepted: 14.04.2016

Abstract. Success or failure of studies in various areas of biology depend on the presence or absence of convenient and effective adequate models of pathologic processes with fair predictability. In spite of variability of models used in contemporary angiology neither of them can be considered to be “golden standard” or etalon for elaborating new methods targeted at blood vessels. The need for a score of different models for studies of each stage of angiogenesis is one of major difficulties in forming a universal concept describing angiogenesis in humans and animals. A hypothesis of malignant neoplasma growth inhibition by means of blocking angiogenesis inducing factors, their receptors or direct destruction of microvessels’ wall is a starting point for profound angiogenesis studies using various *in vitro* and *in vivo* models. A wide spectrum of oncogenesis models allows to scrutinize it from various angles revealing general principles of neoplasma development, mechanisms of its interaction with normal tissues and organs, including the circulation system. Using transgenic animals helped to disclose the key role of angiogenesis in the development of the organism as well as get results maximally close to the effects characteristic of studies of various aspects of angiogenesis in human beings.

Keywords: angiogenesis; biomodelling; tumor; cell-technologies.

Развитие традиционных моделей *in vivo* и *in vitro* для исследования ангиогенеза, начавшееся в прошлом столетии, интенсивно продолжается и в настоящее время. Использование современных биотехнологических и клеточных методических подходов в сочетании с микрофлюидными и литографическими технологиями позволяет в экспериментах воспроизводить состояния, наиболее приближенные к наблюдаемым в клинических условиях, чем это позволяют классические модели ангиогенеза. Примером таких подходов могут служить модели на трансгенных животных и новые классы биомоделей, такие как «орган-на-чипе» или комплексные микрофлюидные системы.

МОДЕЛИРОВАНИЕ АНГИОГЕНЕЗА *IN VITRO*

Первые наблюдения ангиогенеза *in vitro* были произведены Джудом Фолкманом (Moses Judah Folkman) более 35 лет назад [26]. Наблюдая культуру эндотелиоцитов, исследователи фиксировали самостоятельную организацию клеток в капилляраподобные элементы микроangiоны. Наличие в них просвета, достаточного для прохождения клеток крови, было подтверждено методами фазово-контрастной микроскопии и просвечивающей электронной микрографии. Просвет в капилляраподобных структурах является важнейшим критерием, определяющим факт формирования сосуда, при работе с культурами эндотелиоцитов.

С точки зрения физиологии в идеальной модели ангиогенеза *in vitro* должны быть последовательно представлены все этапы развития кровеносного сосуда — от начальной миграции эндотелиоцитов до окончательного формообразования сосудистой трубки, развития внеклеточного матрикса и установления постоянной связи с системой уже функционирующих сосудов. Используемые в настоящее время модели, как правило, чаще всего подходят для описания лишь одного выбранного этапа ангиогенеза или его фрагмента (например, уровня экспрессии VEGF).

Длительный период исследования эндотелиоцитов *in vitro* в различных условиях среды привел к созданию большого количества хорошо описанных клеточных линий, морфологические, биохимические и культуральные особенности которых могут существенно различаться между собой [21]. Наличие подобного разнообразия позволяет исследователям, наряду с внедрением в научную работу современных технических средств, отбирать для изучения конкретных стадий ангиогенеза линии эндотелиоцитов, оптимально (по своему фенотипу и уровню экспрессии молекулярных маркеров) подходящих для решения поставленных задач.

Для поддержания нативных характеристик клеточной линии необходимо оптимально осуществлять жесткий контроль параметров среды после каждого рассева. Линии эндотелиоцитов могут быть распределены в виде монослоя, отдельных клеток или встроены в различные слои в структуре трехмерной модели. Как в двухмерных, так и в трехмерных моделях можно создать пространственную структуру, в которой эндотелиоциты будут находиться в окружении клеток других типов (фибробластов, миоцитов, миобластов, кардиомиоцитов, гепатоцитов или опухолевых клеток) в зависимости от особенностей изучаемого процесса. Комплекс выбранных типов клеток диктует подбор параметров питательной среды и режима культивирования.

Выделяют три основных направления применения моделей *in vitro* для исследования отдельных стадий ангиогенеза: исследование пролиферативной активности, миграционной активности и дифференцировки эндотелиоцитов. Более сложные модели для комплексного изучения финальных этапов образования сети микрососудов широко используются для тестирования ангиогенных и антиангиогенных лекарственных соединений.

В формировании капиллярных трубочек участвуют эндотелиальные клетки, как покрывающие поверхность гелевого матрикса (обычно на основе коллагена или полимерного фибрина), так и находящиеся внутри геля, под воздействием факторов, стимулирующих пролиферацию, дифференциацию и фиксацию эндотелиоцитов. Как правило, такие относительно простые модели используются для скринингового исследования роли потенциальных модуляторов ангиогенеза. Развитие капилляров наблюдаются в течение 4–24 часов, фиксируют на камеру для дальнейшего морфометрического анализа [30].

Используя более сложно устроенную гелевую матрицу (например, Matrigel) для создания трехмерной структуры сосудистых каналов, можно с высокой точностью воссоздать условия, в которых происходит ангиогенез *in vivo*. Наиболее часто применяют «сэндвич-модели» из чередующихся слоев эндотелиальных клеток и слоев внеклеточного матрикса (гель). На начальных этапах (0–7 сут) капиллярная сеть образуется только в горизонтальной плоскости. На второй неделе эксперимента ответвления сосудов прорастают в гель и формируют трехмерную сеть канальцев [27]. В качестве альтернативы «сэндвич-модели» применяются микросфера, покрытые эндотелиальными клетками, которые перемешиваются с гелевыми сферами. В таких условиях можно наблюдать формирование капиллярной сети уже на седьмой день [40]. Существенным

ограничением для вышеуказанных методов получения трехмерной структуры кровеносных сосудов *in vitro* является требование к толщине слоев геля — он должен быть достаточно тонким, чтобы обеспечить диффузию кислорода и питательных веществ к пролиферирующему клеткам, и при этом сохранять потенциал для пространственного роста канальцев.

Модели *in vitro* в основном используются для быстрого получения тех или иных количественных характеристик ангиогенеза или для оценки влияния факторов, влияющих на него. Так, для изучения миграционной активности эндотелиальных клеток применяют трансфильтрационную модель ангиогенеза в модифицированной камере Бойдена [22]. Эти эксперименты, проводимые на трехмерной платформе развития кровеносных сосудов, характеризуют миграцию эндотелиальных клеток, поселяющихся на поверхности фильтра (диаметр пор около 8 мкм), через которые возможно только активное прохождение клеток в сторону хемоаттрактирующего стимула, помещенного в нижней камере [19]. Поверхность фильтра может быть модифицирована белковыми молекулами, коллагеном, фибронектином, комплексными гелевыми матрицами для приближения условий исследования к условиям нативного микроокружения [18]. К достоинствам модели можно отнести высокую чувствительность даже к малым различиям в градиентах концентраций, хорошую воспроизводимость и быстрое получение результата (4–6 часов). Важно отметить, что методика может быть использована для дифференцировки хемотаксиса (направленной миграции по градиенту концентрации хемоаттрактантов) и хемокинеза (ненаправленной локомоторной активности) за счет чередования положительных, отрицательных и нулевых градиентов, изменяя концентрацию соединений-стимулов в верхней и/или нижней камере. Основными недостатками трансфильтрационной модели ангиогенеза являются сложность ее подготовки, необходимость поддержания трансфильтрационных градиентов-стимулов на постоянном уровне в течение длительного периода времени (трудность дозированного восполнения естественной диффузии стимулов с течением времени), отсутствие точной текущей информации о генерируемом градиенте и невозможность наблюдать движение клетки в ходе эксперимента [39].

Более сложной модификацией трехмерных моделей ангиогенеза *in vitro* является использование микрофлюидных систем, изготовленных методами литографии. В настоящее время подобные тест-системы широко применяются для максимально приближенного к физиологическим условиям мо-

делирования работы различных тканей и органов человека, а также при исследованиях биологии клеточных линий, формирующих в микрофлюидной среде ткани организма.

В простом случае на основе двумерного чипа создаются трехмерные клеточные структуры типа «клеточного пластика» (cell-sheet). Использование такой методики позволяет выращивать из клеточной культуры тканеподобную структуру с заданными морфологическими параметрами. Этот метод был впервые представлен в 2003 году в качестве эксперимента по выращиванию клеточной линии кардиомиоцитов [37]. Примером использования такой модели может служить трехмерная модель микроциркуляторного русла человека объемом около 1 мм³ [34]. К недостаткам подхода можно отнести невозможность его использования для объективной оценки процессов тубулогенеза (образования капиллярного русла).

Другим направлением исследований ангиогенеза *in vitro* является изучение влияния различных комбинаций ангиогенных и антиангиогенных факторов на формирование сосудистого русла в условиях перфузируемой сети кровеносных сосудов [24, 25]. Использование таких моделей позволило получить дополнительные сведения, раскрывающие комплексный характер воздействия различных ангиогенных стимулов. В эксперименте на линии эндотелиоцитов пупочной вены человека (HUVEC) было показано, что присутствие в питательной среде только VEGF недостаточно для стимуляции ангиогенеза. При этом комбинация этого фактора роста со спингозинфосфатом (spingosine-1-phosphate) приводила к индукции миграции клеток, а комбинация с форбол-12-миристат-13-ацетатом (phorbol-12-myristate-13-acetate) запускала массовую миграцию эндотелиоцитов [35].

МОДЕЛИРОВАНИЕ АНГИОГЕНЕЗА *IN VIVO*

Несмотря на значительные успехи в области клеточной биологии и биотехнологии, воспроизведение ангиогенеза *in vitro* не позволяет ответить на целый ряд вопросов, касающихся влияния на динамику этого процесса различных системных и местных факторов, действующих в живом организме. Особенно это является критичным для финальных этапов доклинических исследований лекарственных соединений, оказывающих влияние на рост, развитие и функциональное состояние кровеносных сосудов. Это делает актуальной проблему моделирования ангиогенеза на лабораторных животных.

Оценку динамики развития сосудистой сети производят как традиционными морфологическими методами на биопсийном и аутопсийном материале

(плотность микроциркуляторного русла, уровень экспрессии соединений, отражающих функциональное состояние эндотелицитов, — VEGF, vWF, Ki-67, молекулы адгезии клеток), так и при помощи лазерной доплеровской флюметрии, позволяющей неинвазивным способом оценить работу микроциркуляционного русла и перфузию тканей, и иммунологического анализа основных маркеров эндотелиальной дисфункции — VEGF, VEGFR, tPA, PAI-1, NO и эндотелины [10, 11, 13, 36].

Рассматривая имеющийся к настоящему времени задел в области изучения ангиогенеза на животных, следует отметить, что наиболее полно охарактеризованными являются модели опухольиндуцированного неоангиогенеза. Концепция ингибирования роста злокачественных новообразований путем блокирования факторов — индукторов ангиогенеза, рецепторов к ним или прямого разрушения стеники микрососудов, выдвинутая Джудом Фолкманом в 1971 году, послужила отправной точкой для углубленного исследования ангиогенеза на различных моделях *in vitro* и *in vivo*.

Широкий спектр применяемых моделей онкогенеза позволяет изучить его с различных сторон, выявить общие закономерности опухолевого процесса, механизмы взаимодействия новообразований с различными тканями и органами, в том числе и системой кровообращения, и создать теоретическое обоснование методов терапии опухолей [5, 10, 31]. Экспериментальные модели позволяют проводить в сжатые сроки большой объем исследований, что существенно ускоряет апробирование новых лечебных и лечебно-диагностических методик. Различают спонтанные опухоли животных, в том числе опухоли у инбредных животных (высокораковые линии), перевиваемые (трансплантируемые), индуцированные опухоли и модели, использующие злокачественные опухоли человеческого организма. Наиболее часто используемыми моделями являются перевиваемые (трансплантируемые) опухоли [2, 4, 9, 10].

Одним из главных достоинств перевиваемых опухолей является их высокая воспроизведимость, что позволяет проводить потенциально неограниченное количество наблюдений и обеспечить системное изучение параметров опухолевого роста с высоким уровнем статистической значимости получаемых результатов. Способность неопластических клеток переносить криоконсервацию дает возможность создания банков перевиваемых опухолей, что позволяет осуществлять планирование работ с перевиваемым материалом и открывает возможности повторного использования материала в новых исследованиях. Также существенным является то,

что практически любую опухоль животных можно превратить в перевиваемый клон.

Базовые принципы трансплантации новообразований и создания группы перевиваемых опухолей впервые были разработаны Михаилом Матвеевичем Рудневым (1870) и блестяще воплощены на практике его сотрудником и учеником Мстиславом Александровичем Новинским в 1877 году. М.А. Новинский впервые осуществил успешную перевивку злокачественной опухоли от одной собаки другой. Впоследствии на основе этих разработок были созданы многочисленные сингенные модели злокачественных опухолей, исследования на которых придали необходимый импульс развитию онкологии.

При сингенной перевивке новообразования животные-реципиенты и трансплантируемые клетки опухоли имеют общий исходный геном. Поэтому пересаженные ткани не вызывают выраженный ответ иммунной системы реципиента, способный привести к отторжению трансплантата. Иммунная система реципиента в целом функционирует нормально, и механизмы взаимодействия злокачественных клеток с элементами своего микроокружения практически тождественны наблюдаемым при спонтанном канцерогенезе. Это позволяет использовать сингенные перевиваемые модели опухолей для воссоздания физиологически адекватного тканевого окружения новообразования, в том числе исследования механизмов неоангиогенеза. Злокачественные клетки можно трансплантировать в области с различным микроокружением: подкожно, внутримышечно, интраперitoneально — для исследования особенностей микроциркуляционного русла в области формирования первичного опухолевого узла, внутривенно — для изучения ангиогенеза в области развития метастазов [20, 32].

Очевидным недостатком этих моделей опухолевого роста являются значительные генотипические и фенотипические изменения трансплантируемых клеток, возникающие вследствие длительно протекающей опухолевой прогрессии, отличающиеся от клеток, эволюционирующих в спонтанных опухолях, что не позволяет говорить о полной эквивалентности перевиваемых опухолей новообразованиям человека.

В последнее время, наряду с классическими перевиваемыми опухолями, исходно полученными от животных, в арсенал научных и доклинических исследований входят гетеротрансплантируемые новообразования человека, перевиваемые иммунодефицитным животным. Несмотря на то что очевидным преимуществом такого подхода является возможность использования опухолей человека, необходимо отметить, что из-за отсутствия влияния

клеток иммунной системы на процессы опухолевой прогрессии и роста новообразования, не удается полностью воспроизвести «естественное» микрокружение опухоли. В ходе экспериментальных исследований ксенотрансплантантов новообразований у иммунодефицитных мышей наблюдались большие отличия показателей развития опухоли у человека, обусловленные нарушением механизмов иммунного ответа [16, 24]. Создание гуманизированных линий лабораторных животных, способных продуцировать иммунокомпетентные клетки человека, позволило улучшить результаты ксенотрансплантации опухолей.

Ксенотрансплантируемые новообразования различного гистологического типа позволили получить убедительные доказательства о роли процессов ангиогенеза в развитии неоплазии и противоопухолевой эффективности моноклональных антител против VEGF, ангиопоэтинов и рецепторов к ним. Так, было выявлено клинически значимое торможение роста опухолей на фоне антиангиогенной терапии (до 95%) [29]. Помимо непосредственного воздействия на рост новообразований вследствие ограничения перфузии опухолевой ткани антиангиогенные препараты нормализуют структуру кровеносных сосудов в перитуморальной области, что способствует большей эффективности цитостатической терапии и препятствует метастазированию.

Существенным недостатком многих моделей изучения неоангиогенеза оказывается быстрый рост опухолей и малая продолжительность жизни подопытных животных. Одним из путей преодоления этого ограничения является создание трансгенных животных с вызванной повышенной экспрессией определенных онкогенов, что приводит к образованию спонтанной опухоли в прогнозируемые сроки и развивающейся в течение более длительного периода.

Для создания генетически модифицированных линий животных используются две основные методики: введение экзогенного участка гена в оплодотворенные ооциты, в результате чего инородная ДНК встраивается в случайную хромосому в произвольном месте, и гомологичная рекомбинация ДНК, введенной в культивируемую линию эмбриональных клеток, что позволяет осуществлять локус-специфические мутации. В результате можно получить либо повышенную экспрессию онкогенов, либо недостаточный уровень синтеза ингибиторов канцерогенеза.

Именно исследования на трансгенных животных позволили установить ключевую роль ангиогенеза в развитии организма. Полная блокада ключевых факторов ангиогенеза (факторы семейства VEGF

и FGF и/или рецепторов к ним) приводит к гибели животных уже на стадии эмбрионального развития [28].

Наряду с изучением опухоль-ассоциированного ангиогенеза большое значение имеют исследования развития кровеносной системы в жировой ткани подопытных животных. Жировая ткань является одной из наиболее вакуляризованных тканей организма (особенно высока плотность сосудов в бурой жировой ткани).

Привлекательность жировой модели ангиогенеза для исследователей, помимо очевидных причин, обусловленных данными эпидемиологических исследований, прямо указывающих на увеличение в популяции количества людей, страдающих ожирением, связана с хорошей визуализацией кровеносных сосудов в жировой ткани, что позволяет более точно фиксировать и описывать различные этапы их развития.

В настоящее время для исследования ангиогенеза используется ряд охарактеризованных линий мышей, в том числе и генетически модифицированных (ob/ob-мутация, обуславливающая предрасположенность к ожирению, и db/db-аутосомно рецессивная мутация, вызывающая диабет и ожирение) [41]. Вместе с тем у людей ожирение часто обусловлено не только генетическими нарушениями, а связано с увеличением алиментарной нагрузки и неподвижным образом жизни. Это делает актуальными модели с использованием животных, содержащихся на различных диетах, обогащенных углеводами и/или жирами [12, 17]. Неоднородность питания среди животных, обусловленная различным социальным положением особей внутри исследуемых групп, оказывает существенное влияние как на развитие жировой ткани, так и на процессы, связанные с этим развитием (в том числе на ангиогенез), что оказывает негативное влияние на воспроизводимость полученных результатов, преодоление которого возможно либо путем индивидуального содержания животных, либо путем увеличения объема выборки.

Перечисленные выше методы биомоделирования ангиогенеза, как правило, используются для поиска новых стратегий антиангиогенной терапии и тестирования лекарственных препаратов, ингибирующих развитие кровеносных сосудов. Наряду с этими исследованиями большой интерес представляют и другие модели, в которых воспроизводятся процессы стимулирования ангиогенеза, направленного на усиление репаративных процессов в различных органах и тканях. Фундаментальные и доклинические разработки в этой области легли в основу концепции «терапевтического ангиогенеза», являющегося дополнительным направлением

профилактики и лечения ишемических поражений сердца, головного мозга и других органов, вызванных недостаточностью их системы микроциркуляции [3, 6–8, 38].

Для анализа эффективности и безопасности тех или иных воздействий (введение факторов роста, хирургические манипуляции, прекондиционирование) на динамику терапевтического ангиогенеза применяют классические биомодели, воспроизведяющие широко распространенные заболевания — ишемическую болезнь сердца [1], инфаркт головного мозга [14, 15], острую ишемию сосудов задних конечностей животных [23, 33] и др.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на большое количество моделей, применяемых для исследований ангиогенеза, ни одна из них не является в настоящий момент «золотым стандартом». Разработка новых методов воспроизведения механизмов развития кровеносных сосудов ведется в основном в направлении компенсации недостатков существующих моделей, главным из которых является невозможность полностью воспроизвести условия микросреды в органе или ткани, в которых исследуется процесс ангиогенеза на всех его этапах. Предиктивная способность современных моделей ангиогенеза *in vivo* (а тем более *in vitro*) невелика, что подтверждают различия в эффективности наблюдаемых при испытаниях про- и антиангиогенных лекарственных средств в доклинических и клинических исследованиях. Значительный вклад в преодоление этого разрыва должны внести исследования с использованием трансгенных животных, позволяющие получить результаты, максимально близкие к эффектам, наблюдаемым при изучении различных аспектов ангиогенеза у человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Великанова Е.А., и др. Депонирование липосом, содержащих VEGF, после интрамиокардиального и системного введения при экспериментальном инфаркте миокарда // Вестник КемГУ. – 2013. – Т. 3. – С. 8–12. [Velikanova EA, et al. Deponirovanie liposom, soderzhashchikh VEGF, posle intramiokardial'nogo i sistemnogo vvedeniya pri eksperimental'nom infarkte miokarda. *Vestnik KemGU*. 2013;3:8-12 (In Russ).]
2. Вершинина С.Ф., Стуков А.Н. Справочник по экспериментальной терапии опухолей. – СПб., 2008. [Vershinina SF, Stukov AN. Spravochnik po eksperimental'noy terapii opukholey. Saint Petersburg; 2008. (In Russ).]
3. Васильев А.Г., Комяков Б.К., Тагиров Н.С., Мусаев С.А. Чрескожная нефролитотрипсия в лечении коралловидного нефролитиаза // Профилактическая и клиническая медицина. – 2009. – Т. 4. – С. 183–186. [Vasil'ev AG, Komyakov BK, Tagirov NS, Musaev SA. Chreskozhnaya nefrolitotripsiya v lechenii korallovidnogo nefrolitiaza. *Profilakticheskaya i klinicheskaya meditsina*. 2009;4:183-186 (In Russ).]
4. Гельфонд Н.Е., и др. Элементарный состав опухолевой ткани и сыворотки крови в условиях экспериментального канцерогенеза и его коррекции // Бюллетень СО РАМН. – 2005. – Т. 1. – № 115. – С. 28–32. [Gel'fond NE, et al. Elementarnyy sostav opukholevoj tkani i syvorotki krovi v usloviyakh eksperimental'nogo kantserogeneza i ego korrektcii. *Byulleten' SO RAMN*. 2005;1(115):28-32 (In Russ).]
5. Григорян А.С., Шевченко К.Г. Возможные молекулярные механизмы функционирования плазмидных конструкций, содержащих ген VEGF // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. VI. – № 3. – С. 24–28. [Grigoryan AS, Shevchenko KG. Vozmognye molekulyarnye mekhanizmy funktsionirovaniya plazmidnykh konstruktsiy, soderzhashchikh gen VEGF. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. 2011;VI (3):24-28. (In Russ).]
6. Коваль С.Н., и др. Терапевтический ангиогенез при заболеваниях внутренних органов — возможности и перспективы // Вестник проблем биологии и медицины. – 2013. – Т. 1. – № 104. – С. 20–27. [Koval' SN, et al. Terapevticheskiy angiogenez pri zabolевaniyakh vnutrennikh organov — vozmozhnosti i perspektivy. *Vestnik problem biologii i meditsiny*. 2013;1(104):20-27. (In Russ).]
7. Несина И.П., и др. Цитогенетические изменения в клетках перевиваемой линии Namalwa злокачественной лимфомы человека, индуцированные ингибиторами репликации и синтеза ДНК // Цитология и генетика. – 2003. – Т. 37. – № 4. – С. 3–9. [Nesina IP, et al. Tsitogeneticheskie izmeneniya v kletkakh perevivayemoy linii Namalwa zlokachestvennoy limfomy cheloveka, indutsirovannye ingibitorami replikatsii i sinteza DNA. *Tsitologiya i genetika*. 2003; 37(4):3-9. (In Russ).]
8. Тагиров Н.С., Назаров Т.Х., Васильев А.Г., и др. Опыт применения чрескожной нефролитотрипсии и контактной уретеролитотрипсии в комплексном лечении мочекаменной болезни // Профилактическая и клиническая медицина. – 2012. – Т. 4. – С. 30–33. [Tagirov NS, Nazarov TKh, Vasil'ev AG, et al. Opyt primeneniya chreskozhnoy nefrolitotripsi i kontaktnoy ureterolitotripsi v kompleksnom lechenii mochekamennoy bolezni. *Profilakticheskaya i klinicheskaya meditsina*. 2012;4:30-33. (In Russ).]
9. Трашков А.П., Васильев А.Г., Дементьева Е.А., и др. Сравнительная характеристика нарушений рабо-

- ты плазменного компонента системы гемостаза крыс при развитии экспериментальных опухолей различного гистологического типа // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2011. – Т. 1. – № 33. – С. 148–153. [Trashkov AP, Vasil'ev AG, Dement'eva EA, et al. Sravnitel'naya kharakteristika narusheniy raboty plazmennogo komponenta sistemy gemostaza krys pri razvitiu eksperimental'nykh opukholey razlichnogo histologicheskogo tipa. *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii.* 2011;1(33):148-153. (In Russ.)]
10. Трашков А.П., и др. Лейкемия Р-388 у мышей линии CDF1 как тест-система опухоль-ассоциированного неоангиогенеза и гиперкоагуляции // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 158. – № 10. – С. 500–502. [Trashkov AP, et al. Leykemiya R-388 u myshey linii CDF1 kak test-sistema opukhol'-assotsiirovannogo neoangiogeneza i giperkoagulyatsii. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2014;158(10):500-502. (In Russ.)]
11. Трашков А.П., и др. Возрастная динамика маркеров ангиогенеза у трансгенных HER-2/neu (FVB/n) мышей с высокой частотой развитияadenокарцином молочной железы // Вопросы онкологии. – 2015. – Т. 61. – № 4. – С. 642–646. [Trashkov AP, et al. Vozrastnaya dinamika markerov angiogeneza u transgennykh HER-2/neu (FVB/n) myshey s vysokoy chastotoy razvitiya adenokartsinom molochnoy zhelezы. *Voprosy onkologii.* 2015;61(4):642-646. (In Russ.)]
12. Трашков А.П., и др. Метаболическая терапия мочекаменной болезни на различных моделях поражения почек у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78. – № 3. – С. 17–21. [Trashkov AP, et al. Metabolicheskaya terapiya mochekamennoy bolezni na razlichnykh modelyakh porazheniya pochek u krys. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 2015;78(3):17-21. (In Russ.)]
13. Тюренков И.Н., Воронков А.В., Снигур Г.Л. Морфологическая оценка структурных изменений в эндотелии сосудов почек у крыс с экспериментально вызванной недостаточностью сексуальных гормонов // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН. – 2006. – Т. 3. – С. 13. [Tyurenkov IN, Voronkov AV, Snigur GL. Morfologicheskaya otsenka strukturnykh izmeneniy v endotelii sosudov pochek u krys s eksperimental'no vyzvannoy nedostatochnost'yu seksual'nykh gormonov. *Byulleten' Volgogradskogo nauchnogo tsentra RAMN.* 2006;3:13. (In Russ.)]
14. Цыган Н.В., Трашков А.П. Функциональное состояние головного мозга и возможности цитопротекции на модели острой церебральной гипоксии (экспериментальное исследование) // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2013. – Т. 4. – С. 10–16. [Tsygan NV, Trashkov AP. Funktsional'noe sostoyanie golovnogo mozga i vozmozhnosti tsitoprotektsii na modeli ostroy tserebral'noy gipoksi (eksperimental'noe issledovanie). *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2013;4:10-16. (In Russ.)]
15. Цыган Н.В., Однак М.М., Пелешок А.С., и др. Нейропротекция при реконструктивных операциях на дуге аорты // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2012. – Т. 2. – № 38. – С. 119–127. [Tsygan NV, Odinak MM, Peleshok AS, et al. Neyroprotektsiya pri rekonstruktivnykh operatsiyakh na duge aorty. *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii.* 2012;2(38):119-127. (In Russ.)]
16. Чурилов Л.П., Васильев А.Г. Патофизиология иммунной системы. – СПб.: ООО «Издательство ФОЛИАНТ», 2014. [Churilov LP, Vasil'ev AG. Patofiziologiya imunnnoy sistemy. Saint Petersburg: OOO Izdatel'stvo FOLIANT; 2014. (In Russ.)]
17. Ackerman Z, et al. Fructose-induced fatty liver disease: hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction. *Hypertension.* 2005; 45:1012-1018. doi: 10.1161/01.HYP.0000164570. 20420.67.
18. Albini A, et al. The chemo-invasion assay: a tool to study tumor and endothelial cell invasion of basement membranes. *Int J Dev Biol.* 2004; 48(5-6):563-571. doi: 10.1387/ijdb.041822aa.
19. Alessandri G, Raju K, Gullino PM. Mobilization of capillary endothelium *in vitro* induced by effectors of angiogenesis *in vivo*. *Cancer Res.* 1983;43 (4):1790-1797.
20. Anisimov VN, Popovich IG, Zabeyhinski MA, et al. Sex differences in aging, life span and spontaneous tumorigenesis in 129/SV mice neonatally exposed to metformin. *Cell Cycle.* 2015;14(1):46-55. doi: 10.4161/cc.15384101.2014.973308.
21. Auerbach R, et al. Angiogenesis assays: A critical overview. *Clin Chem.* 2003;49(1):32-40. doi: 10.1373/49.1.32.
22. Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med.* 1962;115:453-466. doi: 10.1084/jem.115.3.453.
23. Cao R, et al. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med.* 2003; 9(5):604-613. doi: 10.1038/nm848.
24. Dranoff G. Experimental mouse tumour models: what can be learnt about human cancer immunology? *Nat Rev Immunol.* 2012;12:61-66.

25. Duinen V, et al. Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models. *Curr Opin Biotechnol.* 2015;35:118-126. doi: 10.1016/j.copbio.2015.05.002.
26. Folkman J, Haudenschild C. Angiogenesis *in vitro*. *Nature.* 1980;288(5791):551-556. doi: 10.1038/288551a0.
27. Gagnon E, et al. Human vascular endothelial cells with extended life spans: *In vitro* cell response, protein expression, and angiogenesis. *Angiogenesis.* 2002;5(1-2):21-33. doi: 10.1023/A:1021573013503.
28. Gerber HP, et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development.* 1999;126:1149-1159.
29. Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res.* 2005;65(3):671-680.
30. 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(3):244-251. doi: 10.1097/00000637-199303000-00008.
31. Kociok N, et al. DNA fingerprint analysis reveals differences in mutational patterns in experimentally induced rat tumors, depending on the type of environmental mutagen. *Cancer Genet Cytogenet.* 1999;111:71-76. doi: 10.1016/S0165-4608(98)00221-0.
32. Loi M, et al. The use of the orthotopic model to validate antivascular therapies for cancer. *Int J Dev Biol.* 2011;55(4-5): 547-555. doi: 10.1387/ijdb.103230ml.
33. Lundberg G, et al. A rat model for severe limb ischemia at rest. *Eur Surg Res.* 2003;35(5):430-438. doi: 10.1159/000072228.
34. Moya ML, et al. *In Vitro* Perfused Human Capillary Networks. *Tissue Eng Part C Methods.* 2013;19(9):730-737. doi: 10.1089/ten.tec.2012.0430.
35. Nguyen D, et al. Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(17):6712-6717. doi: 10.1073/pnas.1221526110.
36. Saharinen P. VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis. *Trends Mol Med.* 2011;17(7):347-362. doi: 10.1016/j.molmed.2011.01.015.
37. Shimizu T, et al. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials.* 2003;24(13):2309-2316. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00110-8.
38. Siervo M, et al. Angiogenesis and biomarkers of cardiovascular risk in adults with metabolic syndrome. *J Intern Med.* 2010;268(4):338-347. doi: 10.1111/j.1365-2796.2010.02255.x.
39. Smith JT, et al. Measurement of cell migration on surface-bound fibronectin gradients. *Langmuir.* 2004;20(19):8279-8286. doi: 10.1021/la0489763.
40. Sun X-T, et al. Angiogenic synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in an *in vitro* quantitative microcarrier-based three-dimensional fibrin angiogenesis system. *World J Gastroenterol.* 2004;10(17):2524-2528. doi: 10.3748/wjg.v10.i17.2524.
41. Xue Y, et al. Adipose angiogenesis: quantitative methods to study microvessel growth, regression and remodeling *in vivo*. *Nat Protoc.* 2010;5(5):912-920. doi: 10.1038/nprot.2010.46.

◆ Информация об авторах

Николай Александрович Верлов – канд. мед. наук, старший научный сотрудник. Санкт-Петербургский национальный исследовательский академический университет. E-mail: virlov@gmail.com.

Александр Петрович Трашков – канд. мед. наук, заведующий отделом. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова. E-mail: alexandr.trashkov@gmail.com.

Мария Александровна Пахомова – ст. научн. сотрудник. ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. E-mail: mariya.pahomova@mail.ru.

Николай Валентинович Хайцев – д-р биол. наук, профессор. ГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России. E-mail: nvh195725@gmail.com.

Евгений Иванович Малышев – мл. научн. сотрудник. Санкт-Петербургский национальный исследовательский академический университет. E-mail: virlov@gmail.com.

◆ Information about the authors

Nikolai A. Verlov – MD, PhD, Senior researcher. St Petersburg National Research Academic University. E-mail: virlov@gmail.com.

Alexander P. Trashkov – MD, PhD. Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry named after I.M. Sechenov. E-mail: alexandr.trashkov@gmail.com.

Maria A. Pahomova – MD, Senior researcher. St Petersburg State Pediatric Medical University Ministry of Health of the Russian Federation. E-mail: mariya.pahomova@mail.ru.

Nikolai V. Haitsev – PhD, Professor. St Petersburg State Pediatric Medical University Ministry of Health of the Russian Federation. E-mail: nvh195725@gmail.com.

Evgeni I. Malyshev – Junior researcher. St Petersburg National Research Academic University. E-mail: virlov@gmail.com.