

ВЛИЯНИЕ ДЕПРИВАЦИИ VEGF НА ОБРАЗОВАНИЕ СОСУДОВ ЭНДОТЕЛИЕМ В ПРИСУТСТВИИ МАКРОФАГОВ

Козырева А.Р.¹, Львова Т.Ю.¹, Маркова К.Л.¹, Симбирцев А.С.^{2,3},
Ищенко А.М.³, Сельков С.А.^{1,2}, Соколов Д.И.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Развитие ангиогенеза зависит от функционального состояния эндотелиальных клеток, а также от сбалансированной секреции цитокинов, факторов роста и хемокинов эндотелиальными клетками и клетками микроокружения. Макрофаги являются важнейшим компонентом микроокружения и принимают участие в формировании сосудов как за счет продукции цитокинов, так и за счет контактных взаимодействий с эндотелиальными клетками. Одним из важнейших цитокинов, осуществляющих контроль ангиогенеза на всех его этапах, является VEGF. В настоящее время недостаточно изучена роль VEGF в межклеточных взаимодействиях эндотелиальных клеток и макрофагов.

Целью исследования явилось изучение влияния депривации VEGF при помощи моноклональных антител на ангиогенез в условиях совместного культивирования эндотелия и макрофагов.

Для депривации VEGF использовали моноклональные антитела к VEGF-A в монокультуре эндотелиальных клеток и в сокультуре эндотелиальных клеток с макрофагами. В качестве индукторов использовали цитокины IL-1 β , IL-6 и TNF α . При удалении VEGF-A из среды эндотелиальные клетки проявляют пластичность и формируют более длинные сосуды, изменяют экспрессию рецепторов к VEGF. Макрофаги играют роль регулятора активности эндотелиальных клеток за счет секреции цитокинов, в том числе VEGF, а также благодаря контактным взаимодействиям с эндотелиальными клетками. Клетки линии THP-1 повышают чувствительность эндотелиальных клеток к VEGF за счет стимуляции экспрессии VEGFR1 и VEGFR3, данный эффект является VEGF-A-независимым. Цитокины IL-1 β , IL-6, TNF α самостоятельно стимулируют неразветвляющийся ангиогенез, увеличивая длину сосудов. Параллельно IL-1 β увеличивает экспрессию VEGFR1 на поверхности эндотелиальных клеток, а IL-6 и TNF α , наоборот, снижают ее, тем самым регулируя чувствительность эндотелиальных клеток к VEGF. При этом эффекты данных цитокинов не зависят от VEGF-A. IL-1 β , IL-6, TNF α способствуют приобретению клетками линии THP-1 антиангиогенных свойств, что не зависит от VEGF-A, а также от экспрессии его рецепторов эндотелиальными клетками. Таким образом, VEGF-A является важным, но не единственным фактором, контролирующим ангиогенез. В условиях

Адрес для переписки:

Соколов Дмитрий Игоревич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»
199034, Россия, Санкт-Петербург,
Менделеевская линия, 3.
Тел.: 8 (812) 323-75-45, 328-98-50.
Факс: 8 (812) 323-75-45.
E-mail: falcojugger@yandex.ru

Address for correspondence:

Sokolov Dmitry I.
D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology
199034, Russian Federation, St. Petersburg,
Mendeleevskaya line, 3.
Phone: 7 (812) 323-75-45, 328-98-50.
Fax: 7 (812) 323-75-45.
E-mail: falcojugger@yandex.ru

Образец цитирования:

А.Р. Козырева, Т.Ю. Львова, К.Л. Маркова, А.С. Симбирцев, А.М. Ищенко, С.А. Сельков, Д.И. Соколов «Влияние депривации VEGF на образование сосудов эндотелием в присутствии макрофагов» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 2. С. 231-248. doi: 10.15789/1563-0625-IOV-1894
© Козырева А.Р. и соавт., 2020

For citation:

A.R. Kozyreva, T.Yu. Lvova, K.L. Markova, A.S. Simbirtsev, A.M. Ischenko, S.A. Selkov, D.I. Sokolov "Influence of VEGF deprivation upon vascular formation by endothelium in the presence of macrophages", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 2, pp. 231-248. doi: 10.15789/1563-0625-IOV-1894
DOI: 10.15789/1563-0625-IOV-1894

недостатка VEGF-A либо сами эндотелиальные клетки, либо клетки микроокружения способны компенсировать его функциональную нагрузку за счет продукции других ростовых факторов.

Ключевые слова: эндотелиальные клетки, ангиогенез, цитокины, VEGF, макрофаги, моноциты

INFLUENCE OF VEGF DEPRIVATION UPON VASCULAR FORMATION BY ENDOTHELIUM IN THE PRESENCE OF MACROPHAGES

Kozyreva A.R.^a, Lvova T.Yu.^a, Markova K.L.^a, Simbirtsev A.S.^{b,c},
Ischenko A.M.^c, Selkov S.A.^{a,b}, Sokolov D.I.^{a,b}

^a D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

^b First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

^c State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Development of angiogenesis depends on the functional state of endothelial cells, as well as on the balanced secretion of cytokines, growth factors and chemokines by endothelial cells and cells of microenvironment. Macrophages represent an essential component of the microenvironment and take part in the formation of blood vessels both due to the production of cytokines and due to contact interactions with endothelial cells. VEGF is among the most important cytokines that control angiogenesis at all its stages. Currently, the role of VEGF in the intercellular interactions of endothelial cells and macrophages is not well described. The aim of our study was to investigate the effect of VEGF deprivation using monoclonal antibodies on angiogenesis under conditions of co-cultivation of endothelium and macrophages. Materials and methods: monoclonal antibodies to VEGF-A were used for VEGF deprivation in monoculture of endothelial cells and in co-culture of endothelial cells with macrophages. The IL-1 β , IL-6 and TNF α cytokines were used as inducers. When VEGF-A was removed from the medium, endothelial cells show plasticity and form longer vessels, they modify the expression of VEGF receptors. Macrophages regulate endothelial cell activity through the secretion of cytokines, including VEGF, and through contact interactions with endothelial cells. THP-1 cells increase the sensitivity of endothelial cells to VEGF by stimulating the VEGFR1 and VEGFR3 expression, this effect is VEGF-A-independent. The IL-1 β , IL-6, TNF α cytokines independently stimulate non-branching angiogenesis, increasing the length of the vessels. At the same time, IL-1 β increases the VEGFR1 expression on the surface of endothelial cells. In contrast, IL-6 and TNF α decrease it, thereby regulating the sensitivity of endothelial cells to VEGF. The effects of these cytokines are not dependent on VEGF-A. The IL-1 β , IL-6, TNF α cytokines promote acquisition of anti-angiogenic properties by THP-1 cells that is independent on VEGF-A, as well as on expression of its receptors by endothelial cells. Thus, VEGF is an important, but not the sole factor controlling angiogenesis. Under conditions of VEGF-A deficiency, either endothelial cells or microenvironment cells are able to compensate for its functional load due to the production of other growth factors.

Keywords: endothelial cells, angiogenesis, cytokines, VEGF, macrophages, monocytes

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-15-01230 «Молекулярно-генетические механизмы регуляции ангиогенеза» и бюджетного финансирования по теме НИР № АААА-А19-119021290116-1.

Введение

Ключевым процессом, необходимым для физиологического формирования и адекватного функционирования тканей и органов, является

ангиогенез. Ангиогенез – многоэтапный процесс образования новых кровеносных сосудов из уже существующих. Выделяют следующие этапы ангиогенеза: разрушение внеклеточного матрикса, миграция эндотелиальных клеток (ЭК), пролиферация ЭК, формирование ЭК новой капиллярной трубки, восстановление базальной мембраны [1, 10, 36]. В физиологических условиях ангиогенез встречается во время эмбриогенеза, а также в постнатальном периоде – при заживлении ран и при циклических изменениях в ре-

продуктивной системе женщин. Существенный вклад процессы ангиогенеза вносят в развитие различных патологических состояний, таких как канцерогенез, эндометриоз, атеросклероз, заболевания с выраженным хроническим воспалением [36]. Как при физиологическом состоянии, так и в условиях воспалительного процесса ключевую роль в ангиогенезе отводят макрофагам (Мф) [31, 38, 40, 49]. Контроль ангиогенеза Мф основан на продукции клетками провоспалительных (IL-1 β , IL-8, TNF α , IL-6, IFN γ) и противовоспалительных цитокинов (IL-10), а также факторов роста (VEGF, TGF- β , G-CSF, GM-CSF), которые влияют на функции ЭК (миграция, пролиферация, дифференцировка) и их жизнеспособность, а также на клетки микроокружения, опосредованно влияющие на эндотелий [49]. Преимущественная секреция провоспалительных или противовоспалительных цитокинов Мф зависит от того, какой функциональный тип (M1 или M2) приобретет нативный Мф в зависимости от стимулов микроокружения. Так, липополисахарид в сочетании с IFN γ индуцирует макрофаг M1-типа, характеризуется преимущественной продукцией провоспалительных цитокинов Th1-типа и отвечает за реализацию воспаления. Активация клеток IL-4/IL-13 индуцирует альтернативно активированные макрофаги M2-типа, секретирующие цитокины Th2-типа и участвующие в регуляции ангиогенеза, репарации и ремоделировании ткани, удалении апоптотических телец [28, 54]. Ангиогенный фенотип Мф не до конца охарактеризован, однако показано, что ангиогенную активность проявляют только активированные моноциты и Мф [49]. Наряду с секрецией цитокинов Мф секретируют ряд металлопротеаз, разрушающих внеклеточный матрикс и высвобождающих фрагменты экстрацеллюлярного матрикса и ростовые факторы, способные влиять на ангиогенез [49]. Макрофаги контролируют ветвление сосудов при ангиогенезе за счет взаимодействия с ЭК, выступая в роли мостика, связывающего соседние ЭК [42]. Таким образом, Мф могут влиять на все стадии ангиогенеза, при этом характер влияния макрофагов на процессы ангиогенеза в значительной степени определяется действием цитокинов микроокружения.

Наиболее важным фактором развития сосудистой сети и ее поддержания является VEGF. Хотя многие молекулы участвуют в ангиогенезе, VEGF занимает особое положение, поскольку оказывает прямое митогенное действие на ЭК и является ключевым регулятором как физиологического, так и патологического ангиогенеза [53]. Семейство ростовых факторов VEGF включает в себя изоформы VEGF-A, VEGF-B,

VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E и PLGF. Данные изоформы фактора роста эндотелия сосудов являются лигандами для соответствующих рецепторов: VEGF-A, VEGF-B и PLGF взаимодействуют с VEGF-R1, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E – с VEGF-R2, VEGF-C, VEGF-D – с VEGF-R3. VEGF играет важнейшую роль в таких процессах, как деградация базальной мембраны ЭК и внеклеточного матрикса, пролиферация ЭК, формирование капилляров, синтез новой базальной мембраны. Таким образом, VEGF оказывается вовлечен во все этапы ангиогенеза [39, 46]. Изоформа VEGF-A существует в виде 4 различных подтипов: VEGF121, VEGF165, VEGF189 и VEGF206 [51] и считается первым ростовым фактором, характерным именно для ЭК, который появляется в ходе эмбрионального развития. Некоторые авторы выделяют формы VEGF145 и VEGF183 [1]. Именно VEGF-A является ключевой молекулой, индуцирующей васкулогенез и ангиогенез [39]. VEGF-A был открыт как фактор проницаемости сосудов, затем была показана его роль в пролиферации, миграции, прорастании сосудов и формировании трубок сосудов [13, 39]. Сильнейшим стимулом, вызывающим секрецию VEGF, является гипоксия. В условиях гипоксии HIF-1 связывается с промоторным участком гена VEGF и усиливает транскрипцию с данного участка, обеспечивая повышение синтеза VEGF [39]. Индукторами продукции VEGF также могут служить некоторые гормоны, факторы роста и оксид азота. Кроме ЭК, VEGF экспрессируется другими типами клеток, такими как ГМК сосудов, нейтрофилы, моноциты и макрофаги, кератиноциты, фибробласты и остеобласты, а также синтезируется желтым телом, тканями плаценты и фетальными тканями [39].

В настоящее время недостаточно изучена роль VEGF-A в межклеточных взаимодействиях интактных и активированных цитокинами ЭК и макрофагов. В связи с этим **целью исследования** явилось изучение влияния депривации VEGF при помощи моноклональных антител на ангиогенез в условиях совместного культивирования эндотелия и макрофагов.

Материалы и методы

Клетки

Использовали эндотелиальные клетки линии EA.Hy926, любезно предоставленные Dr. C.J. Edgel (Университет Северной Каролины, США). Они воспроизводят все основные характеристики ЭК [23]. Клетки культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% ЭТС, 100 мкг/мл стрептомицина, 100 ЕД/мл пенициллина, 8 ммоль/л L-глутамин, НАТ (Sigma, США). Пересев производили 1 раз в 3-4 дня, вызывая дезинтеграцию

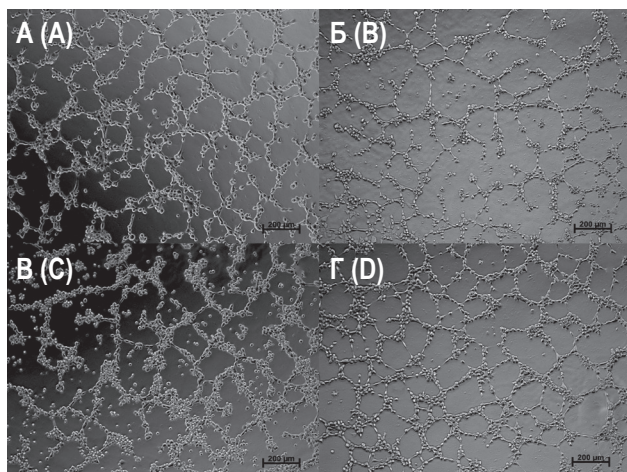


Рисунок 1. Формирование сосудов ЭК линии EA.Hy926

Примечание. А – сосуды, образованные интактными ЭК при монокультивировании в среде, 2,5% ЭТС. Б – при монокультивировании в среде, 2,5% ЭТС, в присутствии bFGF (20 нг/мл). В – в среде, 2,5% ЭТС, в присутствии клеток линии ТНР-1. Г – при монокультивировании в среде, 2,5% ЭТС, в присутствии препарата «Авастин». Увеличение $\times 100$, фазовый контраст.

Figure 1. Formation of Tube-like structures by endothelial cells of the EA.Hy926 cell line

Note. A, tube-like structures formed by intact EC in the presence of 2.5% FBS. B, monoculture, in the presence of 2.5% FBS and bFGF (20 ng/ml). C, in the presence of 2.5% FBS and THP-1 cells. D, monoculture, in the presence of 2.5% FBS and the drug Avastin. Phase contrast, $\times 100$.

монослоя 5-минутной экспозицией в растворе версена (Биолот, Россия). В работе использовали клетки линии ТНР-1, полученные из периферической крови человека с острой моноцитарной лейкемией. Клетки линии ТНР-1 культивировали в среде RPMI-1640, 10% ЭТС, 50 мкг/мл пенициллина, 2 мМ L-глутамина (Sigma, США). Культивирование клеток линии ТНР-1 на различных компонентах экстрацеллюлярного матрикса (коллаген I и IV типа, фибронектин) приводит к изменению их фенотипических и функциональных характеристик, ассоциированных с дифференцировкой в Мф (продукции матриксных металлопротеиназ (ММР), снижению экспрессии CD14 и повышению экспрессии CD71, изменению фагоцитирующей способности, изменению в активности миелопероксидазы (МРО) и β -D-глюкуронидазы) [21, 55]. Наличие в трехмерном матриксе «Матригель» коллагена IV типа предполагает сходные изменения фенотипических и функциональных характеристик клеток линии ТНР-1. Все клеточные линии и эксперименты с ними проводили в инкубаторе во влажной атмосфере при 37 °С, 5% CO₂. Жизнеспособность клеток оценивали при помощи рас-

твора трипанового синего, при этом она составляла не менее 96%.

Цитокины и препараты

Для активации клеток использовали препараты рекомбинантных человеческих цитокинов: 10 ед/мл TNF α («Рефнолин», 1 ед = 0,06 нг; «Фермент», Sanitas, Литва), 10 ед/мл IL-1 β (рекомбинантный IL-1 β , 1 ед = 0,01 нг; производства ФГУП Гос. НИИОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия), 4 нг/мл IL-6 (RD, США). Приведенные концентрации были выбраны на основании данных, полученных ранее [24, 26]. В работе использовали препарат «Авастин» («Бевацизумаб», Roche, Швейцария) – гуманизированные рекомбинантные гиперхимерные моноклональные антитела к VEGF, ингибирующие его связывание с VEGFR1 и VEGFR2 на поверхности ЭК. Предварительные эксперименты показали, что культивирование ЭК на матриксе «Матригель» (BD, США) в присутствии препарата «Авастин» в концентрациях 5 нМ, 500 нМ, 5000 нМ приводило к увеличению длины капилляроподобных структур (далее в тексте статьи – сосудов), образуемых ЭК. Для проведения всех дальнейших экспериментов была выбрана концентрация препарата «Авастин» 5000 нМ, поскольку в монокультуре ЭК в этой концентрации были выявлены наибольшие изменения длины сосудов по сравнению с монокультурой интактных ЭК.

Для оценки влияния цитокинов на формирование сосудов ЭК в присутствии моноцитоподобных клеток линии ТНР-1 и препарата «Авастин» лунки 24-луночного планшета предварительно обрабатывали матриксом Matrigel Growth Factors Reduced («Матригель») (Becton Dickinson, США) с пониженным содержанием ростовых факторов. Данный матрикс представляет собой смесь белков внеклеточного матрикса, таких как ламинин и коллаген IV типа, а также содержит TGF- β , EGF, IGF, bFGF, PA в минорных количествах. «Матригель» является продуктом секреции клеток саркомы мыши линии Engelbreth-Holm-Swarm [20]. В лунки с матриксом вносили ЭК линии EA.Hy926 в концентрации 150 000 клеток в лунку в 1 мл. В часть лунок добавляли клетки линии ТНР-1 в концентрации 250 000 клеток в лунку в 1 мл, цитокины и препарат «Авастин». Затем культивировали в полной культуральной среде с 2,5% ЭТС без добавления НАТ в течение 24 часов при 37 °С и 5% CO₂ в инкубаторе. В качестве контроля инкубировали клетки в среде с 2,5% ЭТС, в качестве положительного контроля – в среде с 2,5% ЭТС и 20 нг/мл bFGF. Установлено, что bFGF увеличивал длину

(76,06±0,61 мкм) сосудов, образованных ЭК линии EA.Hy926, по сравнению с интактными ЭК при их монокультивировании (63,13±0,34 мкм, $p < 0,001$) (рис. 1). Все эксперименты проводили трижды, для каждого индуктора внутри эксперимента использовали по три лунки. При помощи микроскопа AxioObserver.Z1 (Zeiss, Германия) и компьютерной системы анализа изображений ImagePro 6.0 измеряли длину сосудов, образованных ЭК (рис. 1), а также подсчитывали их количество. В каждой лунке производили учет 5 полей зрения.

Для оценки экспрессии рецепторов VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 на эндотелиальных клетках в условиях их совместного культивирования с макрофагами на матриксе «Матригель» в присутствии цитокинов и препарата «Авастин» проводили совместное культивирование ЭК и THP-1 согласно методу, описанному выше. Затем дезинтегрировали матрикс «Матригель» при помощи Cell Recovery Solution (Corning, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для блокировки Fc-рецепторов использовали Fc-blocking reagent (Miltenyi Biotec, США) в соответствии с указаниями производителя. Клетки обрабатывали антителами против CD45 (PerCP) (BD, США), VEGFR1 (PE), VEGFR2 (FITC), VEGFR3 (APC) (RD, США) в соответствии с рекомендациями производителя. В работе использованы соответствующие изотипические контроли. Затем измеряли интенсивность флуоресценции на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США) (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки).

Статистический анализ проводили при помощи программы STATISTICA 10. Для оценки влияния цитокинов на формирование сосудов ЭК в присутствии клеток линии THP-1 и препарата «Авастин», а также для оценки уровня экспрессии рецепторов VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 на ЭК в условиях их совместного культивирования с Мф на трехмерном матриксе «Матригель» использовали *t*-критерий Стьюдента. Проверку нормальности распределения проводили при помощи теста Шапиро–Уилка. Данные выражали в виде $M \pm m$.

Результаты

При совместном культивировании клеток линии THP-1 с ЭК линии EA.Hy926 длина сосудов, образованных ЭК, была больше, а их количество – меньше, по сравнению с таковыми в отсутствие клеток линии THP-1 (рис. 3). Установлено, что после культивирования на матриксе «Матригель» ЭК экспрессировали VEGFR1 и VEGFR3, но не VEGFR2. Установлено, что bFGF не влиял

на экспрессию VEGFR1 и VEGFR3 на поверхности ЭК (рис. 4). В сокультуре ЭК и THP-1 экспрессия VEGFR1 и VEGFR3 ЭК линии EA.Hy926 была выше, чем в монокультуре. Длина сосудов, образованных в монокультуре ЭК в присутствии препарата «Авастин», была больше по сравнению с таковой у интактных ЭК. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» наблюдали увеличение длины сосудов по сравнению с монокультурой интактных ЭК. При этом препарат «Авастин» уменьшал длину сосудов в присутствии THP-1 по сравнению с культивированием в тех же условиях, но в отсутствие препарата «Авастин». Количество образованных сосудов было меньше в сокультуре ЭК и THP-1 как в отсутствие, так и в присутствии препарата «Авастин» по сравнению с интактной монокультурой ЭК (рис. 3).

В сокультуре ЭК и THP-1 количество VEGFR1⁺ и VEGFR3⁺ ЭК, а также интенсивность экспрессии ими VEGFR1 и VEGFR3 были больше по сравнению с монокультурой интактных ЭК. Эти изменения не зависели от присутствия или отсутствия препарата «Авастин» (рис. 5). В монокультуре ЭК в присутствии препарата «Авастин» наблюдали снижение интенсивности экспрессии VEGFR3 по сравнению с таковой в монокультуре интактных ЭК. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» относительное количество VEGFR3⁺ ЭК, а также интенсивность экспрессии ими VEGFR3 были выше по сравнению с монокультурой интактных ЭК и по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии препарата «Авастин» (рис. 5).

В монокультуре ЭК в присутствии IL-1 β отмечено увеличение длины сосудов по сравнению с интактными клетками. При одновременном добавлении к монокультуре препарата «Авастин» и IL-1 β длина сосудов также была больше по сравнению со спонтанным уровнем, но меньше по сравнению с длиной сосудов в присутствии только препарата «Авастин» или по сравнению с культивированием ЭК в присутствии только IL-1 β (рис. 3). Относительное количество VEGFR1⁺ ЭК, а также интенсивность экспрессии VEGFR1 в монокультуре ЭК в присутствии IL-1 β были выше по сравнению с интактными клетками. Относительное количество VEGFR1⁺ ЭК и интенсивность экспрессии VEGFR1 в монокультуре ЭК в присутствии препарата «Авастин» и IL-1 β также были выше по сравнению с таковыми в монокультуре интактных ЭК; но при этом интенсивность экспрессии VEGFR1 на ЭК была выше, чем в присутствии только препарата «Авастин» (рис. 5).

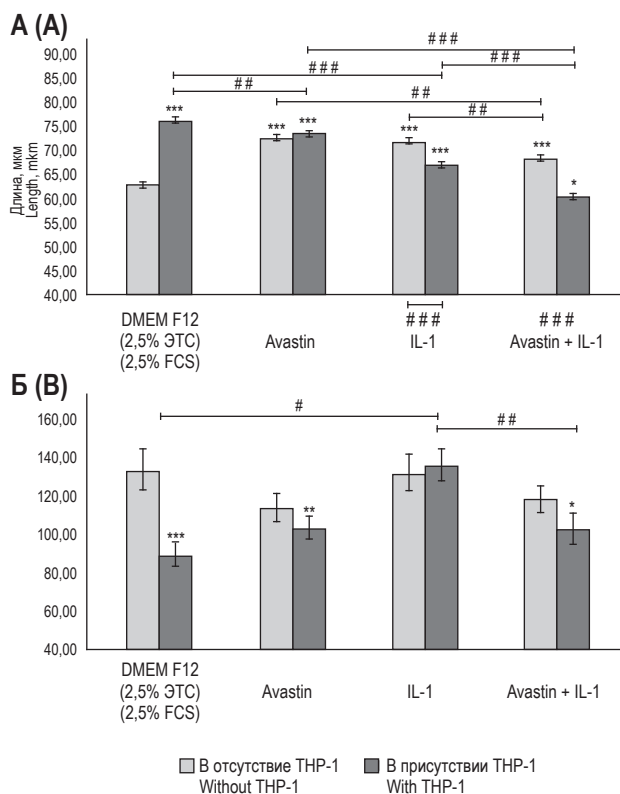


Рисунок 3. Влияние IL-1β на формирование сосудов ЭК линии EA.Hy926 в присутствии клеток линии THP-1 и препарата «Авастин»

Примечание. А – влияние на длину сосудов. Б – влияние на количество сосудов. DMEM F12 – культивирование в среде без HAT, 2,5% ЭТС, спонтанный уровень, n = 45; Avastin – культивирование в присутствии препарата «Авастин», n = 45; IL-1 – культивирование в присутствии IL-1β, n = 15; Avastin + IL-1 – культивирование в присутствии препарата «Авастин» и IL-1β, n = 15. Достоверность различий: * – p < 0,05; ** – p < 0,01; *** – p < 0,001 (отличается от уровня при монокультивировании интактных ЭК); # – p < 0,05; ## – p < 0,01; ### – p < 0,001.

Figure 3. Effect of IL-1β on the formation of tube-like structures by endothelial cells of the EA.Hy926 cell line in the presence of THP-1 cells and the drug Avastin

Note. A, the effect on the length of tube-like structures. B, the effect on the number of tube-like structures. DMEM F12, cultivation in a medium without HAT, 2.5% FBS (spontaneous level), n = 45; Avastin, cultivation in the presence of the drug Avastin, n = 45; IL-1, cultivation in the presence of IL-1β, n = 15; Avastin + IL-1, cultivation in the presence of the drug Avastin and IL-1β, n = 15. The significance of differences between groups: *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001 (differs from the spontaneous level); #, p < 0.05; ##, p < 0.01; ###, p < 0.001.

В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии IL-1β отмечено увеличение длины сосудов по сравнению с таковой в монокультуре интактных ЭК и в то же время снижение длины сосудов по сравнению с сокультурой ЭК и THP-1 в отсутствие индукторов. Длина сосудов в сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии IL-1β была ниже по срав-

нению с монокультурой ЭК в присутствии IL-1β. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и IL-1β наблюдали уменьшение длины сосудов по сравнению с таковой в монокультуре интактных ЭК, а также по сравнению с сокультурой ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» или по сравнению с сокультурой ЭК и THP-1 с добавлением IL-1β. Отмечено уменьшение длины сосудов в сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и IL-1β, по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии тех же индукторов (рис. 3). Количество сосудов в сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии IL-1β было больше по сравнению с сокультурой ЭК и THP-1 в отсутствие индукторов. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и IL-1β количество сосудов было меньше по сравнению с монокультурой интактных ЭК и по сравнению с сокультурой ЭК и THP-1 в присутствии IL-1β (рис. 3).

В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии IL-1β количество VEGFR1⁺ ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR1 были выше по сравнению с монокультурой интактных или активированных IL-1β ЭК. При этом в данных условиях количество VEGFR1⁺ ЭК было больше по сравнению с сокультурой ЭК и THP-1 в отсутствие индукторов. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и IL-1β количество VEGFR1⁺ ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR1 были выше по сравнению с монокультурой интактных ЭК, а также по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии тех же индукторов, по сравнению с сокультурой ЭК и THP-1 в отсутствие индукторов, по сравнению с сокультурой ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» (рис. 5).

В монокультуре ЭК в присутствии IL-1β количество VEGFR3⁺ ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR3 не изменялись по сравнению с интактной монокультурой. Однако количество VEGFR3⁺ ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR3 в монокультуре в присутствии препарата «Авастин» и IL-1β оказались больше по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии только препарата «Авастин» (рис. 5). В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии IL-1β интенсивность экспрессии VEGFR3 на ЭК была выше по сравнению с монокультурой интактных ЭК, а также по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии IL-1β. При добавлении препарата «Авастин» и IL-1β в сокультуру ЭК и THP-1 интенсивность экспрессии VEGFR3 на ЭК была выше по сравнению с монокультивированием интактных ЭК,

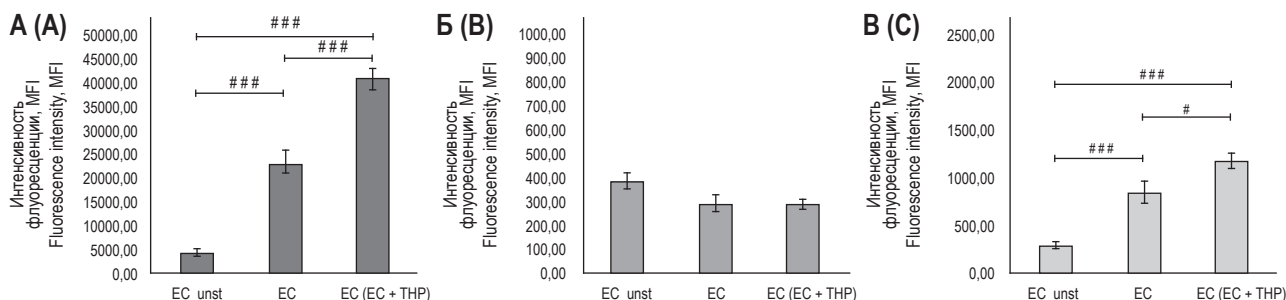


Рисунок 4. Экспрессия рецепторов фактора роста эндотелия сосудов на эндотелиальных клетках линии EA.Hy926

Примечание. А – экспрессия VEGFR1. Б – VEGFR2. В – VEGFR3. EC_unst – неокрашенные ЭК, n = 8; EC – ЭК, меченные антителами с флуоресцентной меткой к соответствующему рецептору, n = 8; EC (EC + THP) – ЭК после совместного культивирования с клетками линии THP-1, меченные антителами с флуоресцентной меткой к соответствующему рецептору, n = 16. Достоверность различий: # – p < 0,05; ### – p < 0,001.

Figure 4. Expression of vascular endothelial growth factor receptors on the surface of endothelial cells of the EA.Hy926 cell line
Note. A, the expression of VEGFR1. B, VEGFR2. C, VEGFR3. EC_unst, untreated EC, n = 8; EC, EC treated with antibodies with a fluorescent label to the corresponding receptor, n = 8; EC (EC + THP), EC after co-culture with THP-1 cells, treated with antibodies with a fluorescent label to the corresponding receptor, n = 16. The significance of differences: #, p < 0.05; ###, p < 0.001.

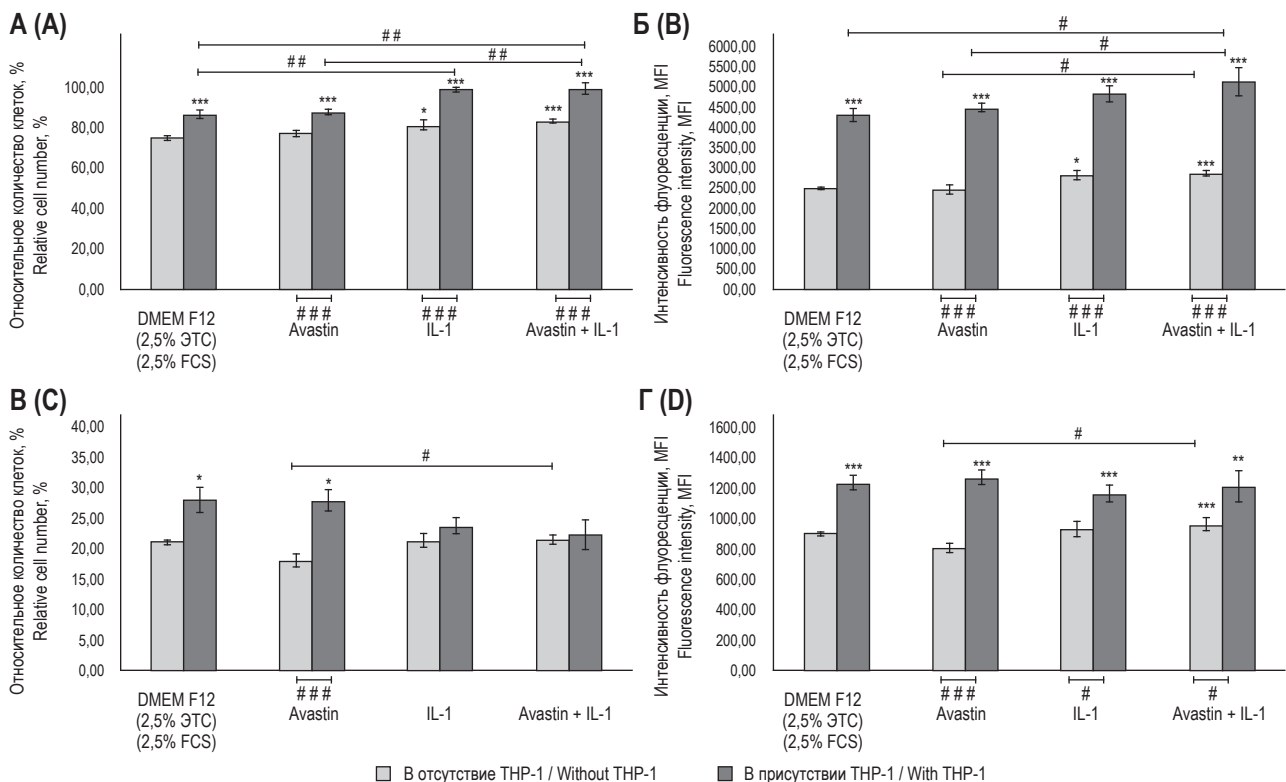


Рисунок 5. Влияние IL-1β на экспрессию VEGFR1 и VEGFR3 эндотелиальными клетками в условиях их совместного культивирования с клетками линии THP-1

Примечание. А, Б – экспрессия VEGFR1. В, Г – экспрессия VEGFR3. DMEM F12 – культивирование в среде без HAT, 2,5% ЭТС, спонтанный уровень, n = 16; Avastin – культивирование в присутствии препарата «Авастин», n = 24; IL-1 – культивирование в присутствии IL-1β, n = 6; Avastin + IL-1 – культивирование в присутствии препарата «Авастин» и IL-1β, n = 6. Достоверность различий: * – p < 0,05; ** – p < 0,01, *** – p < 0,001 (отличается от уровня при монокультивировании интактных ЭК); # – p < 0,05; ## – p < 0,01; ### – p < 0,001.

Figure 5. Effect of IL-1β on the expression of VEGFR1 and VEGFR3 by endothelial cells under conditions of their co-cultivation with THP-1 cells

Note. A, B, the expression of VEGFR1. C, D, the expression of VEGFR3. DMEM F12, cultivation in a medium without HAT, 2.5% FBS (spontaneous level), n = 16; Avastin, cultivation in the presence of the drug Avastin, n = 24; IL-1, cultivation in the presence of IL-1β, n = 6; Avastin + IL-1, cultivation in the presence of the drug Avastin and IL-1β, n = 6. The significance of differences between groups: *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001 (differs from the spontaneous level); #, p < 0.05; ##, p < 0.01; ###, p < 0.001.

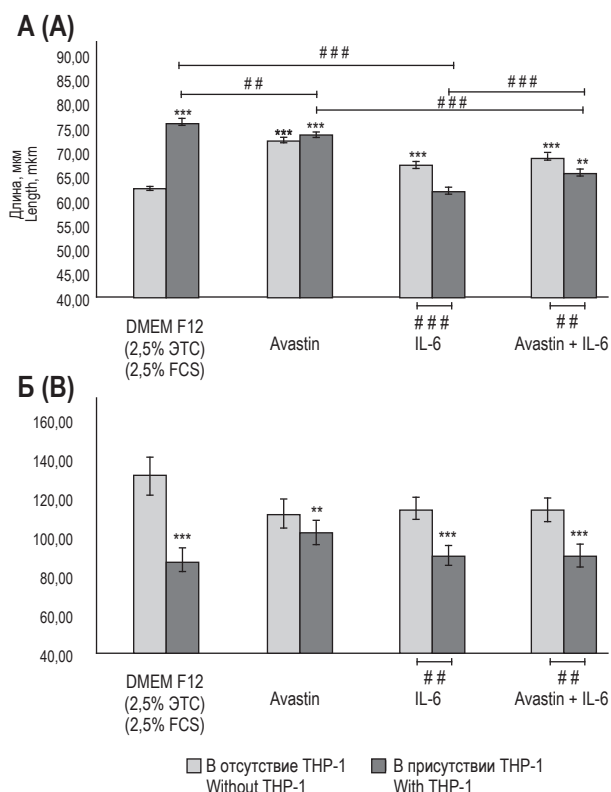


Рисунок 6. Влияние IL-6 на формирование сосудов ЭК линии EA.Hy926 в присутствии клеток линии THP-1 и препарата «Авастин»

Примечание. А – влияние на длину сосудов. Б – влияние на количество сосудов. DMEM F12 – культивирование в среде без HAT, 2,5% ЭТС, спонтанный уровень, n = 45; Avastin – культивирование в присутствии препарата «Авастин», n = 30 (в отсутствие клеток линии THP-1), n = 45 (в присутствии клеток линии THP-1); IL-6 – культивирование в присутствии IL-6, n = 15; Avastin + IL-6 – культивирование в присутствии препарата «Авастин» и IL-6, n = 15. Достоверность различий: ** – p < 0,01; *** – p < 0,001 (отличается от уровня при монокультивировании интактных ЭК); ## – p < 0,01; ### – p < 0,001.

Figure 6. Effect of IL-6 on the formation of tube-like structures by endothelial cells of the EA.Hy926 cell line in the presence of THP-1 cells and the drug Avastin

Note. A, the effect on the length of tube-like structures. B, the effect on the number of tube-like structures. DMEM F12, cultivation in a medium without HAT, 2.5% FBS (spontaneous level), n = 45; Avastin, cultivation in the presence of the drug Avastin, n = 30 (in the absence of THP-1 cells), n = 45 (in the presence of THP-1 cells); IL-6, cultivation in the presence of IL-6, n = 15; Avastin + IL-6, cultivation in the presence of the drug Avastin and IL-6, n = 15. The significance of differences between groups: **, p < 0.01; ***, p < 0.001 (differs from the spontaneous level); ##, p < 0.01; ###, p < 0.001.

а также по сравнению с монокультивированием ЭК в присутствии тех же индукторов (рис. 5).

В монокультуре ЭК в присутствии IL-6 было отмечено увеличение длины сосудов по сравнению с монокультурой интактных ЭК. Длина сосудов в монокультуре ЭК в присутствии препара-

та «Авастин» и IL-6 была больше по сравнению с таковой в монокультуре интактных ЭК (рис. 6). В монокультуре ЭК в присутствии IL-6, а также в присутствии препарата «Авастин» и IL-6 интенсивность экспрессии VEGFR1 ЭК была ниже по сравнению с монокультурой интактных ЭК (рис. 7). Количество VEGFR3⁺ ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR3 в монокультуре ЭК в присутствии IL-6, а также в присутствии препарата «Авастин» и IL-6 были меньше по сравнению с таковыми в монокультуре интактных ЭК (рис. 7).

Длина сосудов в сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии IL-6 была меньше по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии IL-6 и по сравнению с сокультурой ЭК и THP-1 в отсутствие индукторов. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и IL-6 было отмечено увеличение длины сосудов по сравнению со спонтанным уровнем без индукторов. В этих условиях длина сосудов была меньше по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии препарата «Авастин» и IL-6. Длина сосудов в сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и IL-6 была больше по сравнению с сокультурой в присутствии только препарата «Авастин» (рис. 6). Количество сосудов в сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии IL-6 было меньше по сравнению с таковым в монокультуре интактных ЭК или активированных IL-6 ЭК. Снижение количества сосудов по сравнению с таковым в монокультуре интактных ЭК также было отмечено в сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и IL-6. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и IL-6 количество сосудов было меньше по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии тех же индукторов (рис. 6).

В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии IL-6 количество VEGFR1⁺ ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR1 были больше по сравнению с монокультурой интактных или активированных IL-6 ЭК. При добавлении препарата «Авастин» и IL-6 в сокультуру ЭК и THP-1 количество VEGFR1⁺ ЭК было больше по сравнению с монокультурой интактных ЭК и меньше по сравнению с сокультурой ЭК и THP-1 в присутствии только препарата «Авастин». В сокультуре интенсивность экспрессии VEGFR1 на ЭК была выше по сравнению с таковой в монокультуре интактных ЭК и по сравнению с монокультурой в присутствии тех же индукторов. В сокультуре интенсивность экспрессии VEGFR1 на ЭК была ниже по сравнению с таковой в сокультуре

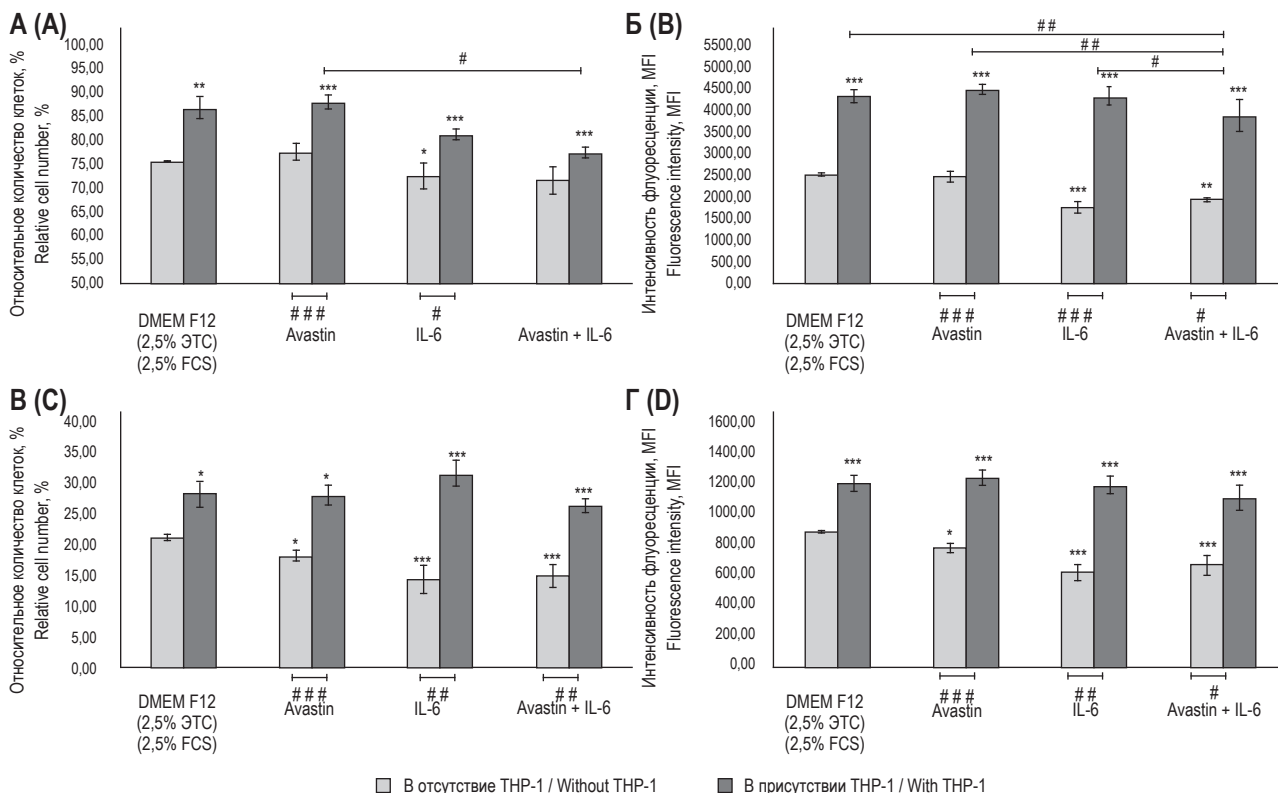


Рисунок 7. Влияние IL-6 на экспрессию VEGFR1 и VEGFR3 эндотелиальными клетками в условиях их совместного культивирования с клетками линии THP-1

Примечание. А, Б – экспрессия VEGFR1. В, Г – экспрессия VEGFR3. DMEM F12 – культивирование в среде без HAT, 2,5% ЭТС, спонтанный уровень, n = 16; Avastin – культивирование в присутствии препарата «Авастин», n = 24; IL-6 – культивирование в присутствии IL-6, n = 3; Avastin + IL-6 – культивирование в присутствии препарата «Авастин» и IL-6, n = 3. Достоверность различий: * – p < 0,05; ** – p < 0,01, *** – p < 0,001 (отличается от уровня при монокультивировании интактных ЭК); # – p < 0,05; ## – p < 0,01; ### – p < 0,001.

Figure 7. Effect of IL-6 on the expression of VEGFR1 and VEGFR3 by endothelial cells under conditions of co-cultivation with THP-1 cells

Note. A, B, the expression of VEGFR1. C, D, the expression of VEGFR3. DMEM F12, cultivation in a medium without HAT, 2.5% FBS (spontaneous level), n = 16; Avastin, cultivation in the presence of the drug Avastin, n = 24; IL-6, cultivation in the presence of IL-6, n = 3; Avastin + IL-6, cultivation in the presence of the drug Avastin and IL-6, n = 3. The significance of differences between groups: *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001 (differs from the spontaneous level); #, p < 0.05; ##, p < 0.01; ###, p < 0.001.

в отсутствие индукторов, в присутствии только препарата «Авастин» или в присутствии только IL-6 (рис. 7).

В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии IL-6 количество VEGFR3⁺ ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR3 были выше по сравнению с монокультурой интактных или активированных IL-6 ЭК. Также в сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и IL-6 количество VEGFR3⁺ ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR3 были выше по сравнению с монокультурой интактных или активированных теми же индукторами ЭК (рис. 7).

Длина сосудов в монокультуре ЭК в присутствии TNFα была больше по сравнению с интактной монокультурой ЭК. В монокультуре ЭК в присутствии препарата «Авастин» и TNFα от-

мечено увеличение длины сосудов по сравнению с монокультурой интактных ЭК (рис. 8). В монокультуре ЭК в присутствии TNFα количество VEGFR1⁺ ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR1 были меньше по сравнению с монокультурой интактных ЭК. Этот эффект сохранялся в монокультуре ЭК в присутствии препарата «Авастин» и TNFα. При этом в монокультуре ЭК в присутствии препарата «Авастин» и TNFα количество VEGFR1⁺ ЭК было меньше по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии только препарата «Авастин» (рис. 9). В сокультуре ЭК и THP-1 интенсивность экспрессии VEGFR3 была ниже по сравнению с монокультурой интактных ЭК. В монокультуре ЭК в присутствии препарата «Авастин» и TNFα количество VEGFR3⁺ ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR3 были

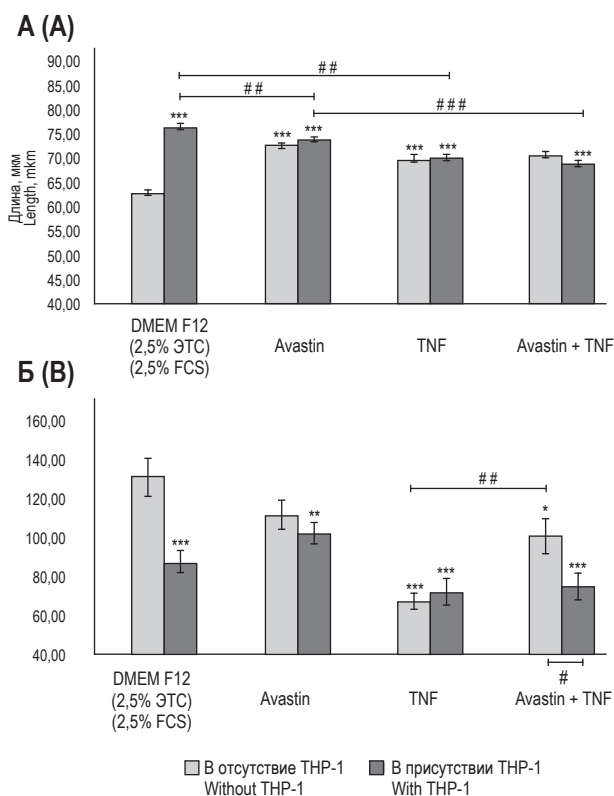


Рисунок 8. Влияние TNF α на формирование сосудов ЭК линии EA.Hy926 в присутствии клеток линии THP-1 и препарата «Авастин»

Примечание. А – влияние на длину сосудов. Б – влияние на количество сосудов. DMEM F12 – культивирование в среде без HAT, 2,5% ЭТС, спонтанный уровень, n = 45; Avastin – культивирование в присутствии препарата «Авастин», n = 45; TNF α – культивирование в присутствии TNF α , n = 15; Avastin + TNF α – культивирование в присутствии препарата «Авастин» и TNF α , n = 15. Достоверность различий: * – p < 0,05; ** – p < 0,01; *** – p < 0,001 (отличается от уровня при монокультивировании интактных ЭК); # – p < 0,05; ## – p < 0,01; ### – p < 0,001.

Figure 8. Effect of TNF α on the formation of tube-like structures by endothelial cells of the EA.Hy926 cell line in the presence of THP-1 cells and the drug Avastin

Note. A, the effect on the length of tube-like structures. B, the effect on the number of tube-like structures. DMEM F12, cultivation in a medium without HAT, 2.5% FBS (spontaneous level), n = 45; Avastin, cultivation in the presence of the drug Avastin, n = 45; TNF α , cultivation in the presence of TNF α , n = 15; Avastin + TNF α , cultivation in the presence of the drug Avastin and TNF α , n = 15. The significance of differences between groups: *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001 (differs from the spontaneous level); #, p < 0.05; ##, p < 0.01; ###, p < 0.001.

ниже по сравнению с монокультурой интактных ЭК. При этом количество VEGFR3⁺ ЭК было меньше по сравнению с монокультурой в присутствии препарата «Авастин» (рис. 9).

В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии TNF α длина сосудов была больше по сравнению с мо-

нокulturой интактных ЭК, но меньше по сравнению с длиной сосудов в интактной сокультуре. Длина сосудов в сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и TNF α была больше по сравнению с монокультурой интактных ЭК, но меньше по сравнению с сокультурой в присутствии препарата «Авастин» (рис. 8). Количество сосудов в монокультуре в присутствии TNF α было меньше по сравнению с интактной монокультурой ЭК. В монокультуре ЭК в присутствии препарата «Авастин» и TNF α количество сосудов по сравнению с монокультурой интактных ЭК было меньше, но больше по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии TNF α (рис. 8).

В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии TNF α количество сосудов было меньше по сравнению с интактной сокультурой. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и TNF α количество сосудов было меньше по сравнению с монокультурой интактных ЭК, а также по сравнению с монокультурой ЭК в присутствии препарата «Авастин» и TNF α (рис. 8).

В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии TNF α относительное количество VEGFR1⁺ ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR1 были больше по сравнению с таковыми в монокультуре интактных или активированных TNF α ЭК. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и TNF α количество VEGFR1⁺ ЭК было меньше по сравнению с монокультурой интактных ЭК, а интенсивность экспрессии VEGFR1 ЭК была выше по сравнению с интактной или активированной теми же индукторами монокультурой ЭК. Количество VEGFR1⁺ ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR1 в сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и TNF α были ниже по сравнению с интактной сокультурой. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и TNF α интенсивность экспрессии VEGFR1 ЭК была ниже по сравнению с сокультурой в присутствии только TNF α или в присутствии только препарата «Авастин» (рис. 9).

В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии TNF α количество VEGFR3⁺ ЭК и интенсивность экспрессии ими VEGFR3 ЭК были выше по сравнению с монокультурой интактных или активированных TNF α ЭК. В сокультуре ЭК и THP-1 в присутствии препарата «Авастин» и TNF α интенсивность экспрессии VEGFR3 ЭК была выше по сравнению с интактной или активированной теми же индукторами монокультурой ЭК (рис. 9).

Обсуждение

Ангиогенез регулируется множеством факторов, зависит от функционального состояния ЭК

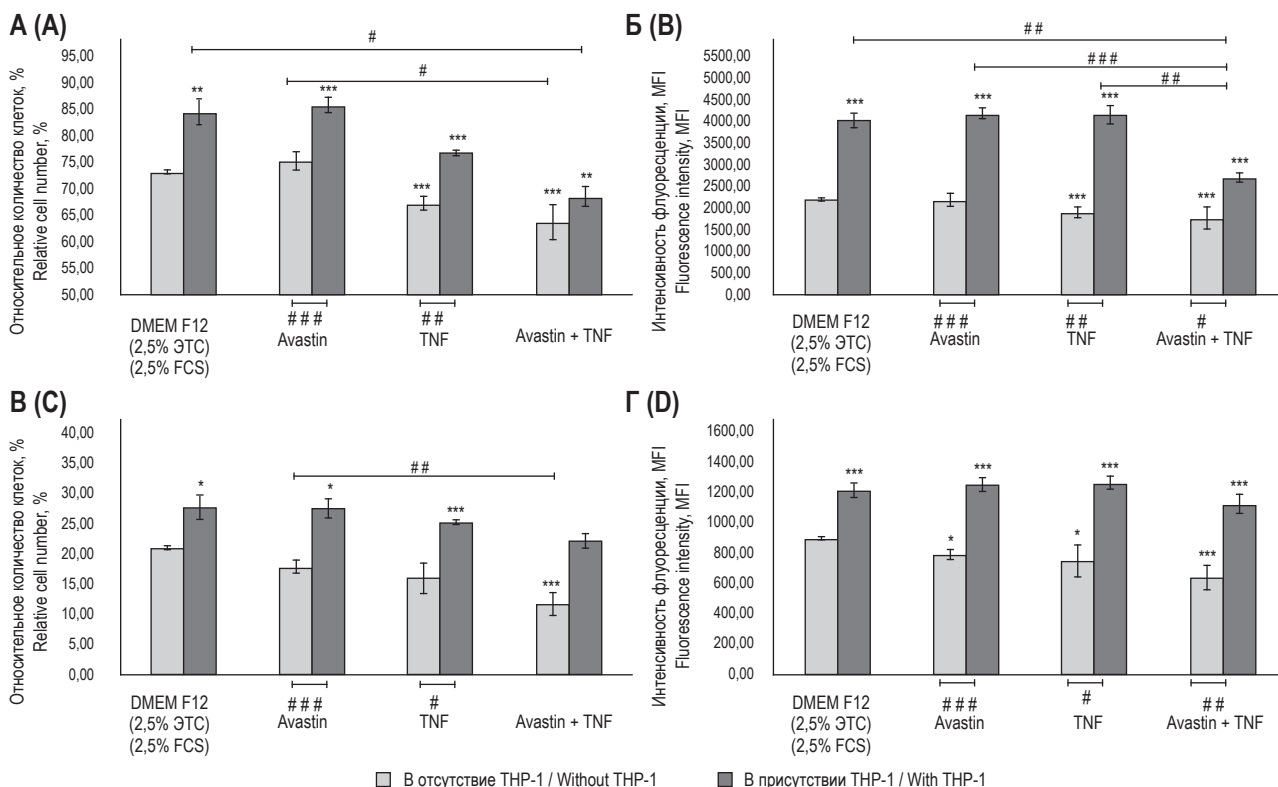


Рисунок 9. Влияние TNFα на экспрессию VEGFR1 и VEGFR3 эндотелиальными клетками в условиях их совместного культивирования с клетками линии THP-1

Примечание. А, Б – экспрессия VEGFR1. В, Г – экспрессия VEGFR3. DMEM F12 – культивирование в среде без HAT, 2,5% ЭТС, спонтанный уровень, n = 16; Avastin – культивирование в присутствии препарата «Авастин», n = 24; TNFα – культивирование в присутствии TNFα, n = 3; Avastin + TNFα – культивирование в присутствии препарата «Авастин» и TNFα, n = 3. Достоверность различий: * – p < 0,05; ** – p < 0,01, *** – p < 0,001 (отличается от уровня при монокультивировании интактных ЭК); # – p < 0,05; ## – p < 0,01; ### – p < 0,001.

Figure 9. Effect of TNFα on the expression of VEGFR1 and VEGFR3 by endothelial cells under conditions of their co-cultivation with THP-1 cells

Note. A, B, the expression of VEGFR1. B, D, the expression of VEGFR3. DMEM F12, cultivation in a medium without HAT, 2.5% FBS (spontaneous level), n = 16; Avastin, cultivation in the presence of the drug Avastin, n = 24; TNFα, cultivation in the presence of TNFα, n = 3; Avastin + TNFα, cultivation in the presence of the drug Avastin and TNFα, n = 3. The significance of differences between groups: *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001 (differs from the spontaneous level); #, p < 0.05; ##, p < 0.01; ###, p < 0.001.

и клеток микроокружения. Макрофаги – активные участники ангиогенеза, они регулируют его благодаря секреции цитокинов и контактными взаимодействиями с ЭК [12, 22, 42]. Для оценки вклада в регуляцию ангиогенеза VEGF, а также изучения изменения экспрессии рецепторов для VEGF на ЭК мы культивировали клетки линии EA.Hy926 на матриксе «Матригель» в присутствии цитокинов и препарата «Авастин». Для оценки вклада Мф в регуляцию ангиогенеза мы сокультивировали ЭК с клетками линии THP-1 в присутствии цитокинов и препарата «Авастин». Препарат «Авастин», представляющий собой моноклональные антитела, связывающие VEGF-A, ингибирует его взаимодействие с рецепторами на поверхности клеток [33, 58].

Нами установлено, что клетки линии THP-1 способствовали увеличению длины сосудов, образованных ЭК, но при этом снижали их количество, то есть стимулировали неразветвляющийся ангиогенез. Ранее установлено, что некоторые компоненты внеклеточного матрикса, такие как коллаген I и IV типа, а также фибронектин, вызывают изменения фенотипа и функций моноцитов, выделенных из периферической крови, ассоциированные с их дифференцировкой в Мф [21]. Таким образом, коллаген IV типа, входящий в состав матрикса «Матригель», может способствовать проявлению у клеток линии THP-1 свойств Мф. Ранее в нашей лаборатории было показано, что клетки линии THP-1 при культивировании на матриксе «Матригель» приобретают схожий фенотип с Мф [27]. Макрофаги явля-

ются источниками $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-10, TGF- β , VEGF-A, VEGF-C, bFGF, PDGF, MMPs [3, 43]. IL-8, bFGF, VEGF оказывают митогенное воздействие на ЭК, способствуют их выживаемости, стимулируют миграцию ЭК. Установлено, что IL-8 стимулирует продукцию MMP-2, обеспечивающей деградацию и ремоделирование внеклеточного матрикса [1]. VEGF-A контролирует ангиогенез на всех стадиях, включая стабилизацию сосудов. Подобным действием обладает Ang1, секретируемый моноцитами в результате их совместного культивирования с ЭК [16, 25, 26, 44]. В связи с этим можно предположить, что увеличение длины сосудов может быть вызвано продукцией этих цитокинов клетками линии THP-1. С другой стороны, в исследованиях на мышцах показано взаимодействие Мф с филоподиями tip-клеток растущего сосуда и их участие в образовании анастомозов сосудами, причем этот процесс не зависит от VEGF [12]. Такой механизм взаимодействия ЭК и Мф может обеспечивать формирование более длинных сосудов; тем не менее молекулярные причины указанного явления остаются не до конца изученными [18]. Мф участвуют в создании градиента гепарин-связанного VEGF в матриксе, обеспечивая тем самым хемотаксис ЭК и направленный рост сосудов [12]. В нашей модели клетки линии THP-1, дифференцируясь в Мф, могут стимулировать образование более длинных сосудов как за счет секреции цитокинов, так и за счет контактных взаимодействий с ЭК и направлять рост сосудов, создавая градиент VEGF.

В сокультуре ЭК с клетками линии THP-1 нами отмечено повышение экспрессии VEGFR1 и VEGFR3 ЭК. В литературе описана колокализация и повышенная экспрессия VEGF-A и VEGFR1, что может служить доказательством положительной регуляции VEGFR1, опосредованной этой изоформой VEGF [6, 47, 57]. В связи с этим можно предположить, что отмеченный нами эффект может быть вызван VEGF-A, секретируемым Мф и являющимся лигандом для VEGFR1. Ранее отмечено, что на ЭК увеличивается экспрессия VEGFR3 при воздействии на них VEGF-A [8], что также согласуется с полученными нами данными. Некоторые авторы утверждают, что сигналинг VEGFR1 необходим для выживания ЭК, в то время как VEGFR2-сигналинг обуславливает формирование сосудов ЭК [57]. Однако в нашем исследовании не было обнаружено экспрессии VEGFR2 на ЭК, в то время как сосуды формировались. Вероятно, существуют иные механизмы регуляции формирования сосудов либо сигнальные пути этих двух

рецепторов имеют общие компоненты и пересекаются, компенсируя друг друга.

Отмеченное нами увеличение длины сосудов в монокультуре ЭК в присутствии препарата «Авастин» можно объяснить компенсаторной продукцией ЭК таких проангиогенных факторов, как bFGF [1, 9, 14]. При этом препарат «Авастин», уменьшающий концентрацию свободного VEGF-A в культуральной среде, вызывал снижение экспрессии VEGFR3, что согласуется с данными о способности VEGF-A повышать экспрессию этого рецептора [8]. Несмотря на то, что в литературе описана прямая корреляция между экспрессией VEGF-A и VEGFR1, в связи с чем можно судить о существовании аутокринной петли VEGF-A/VEGFR1, поддерживающей экспрессию VEGFR1 [47, 57], в настоящем исследовании препарат «Авастин» не оказывал влияния на экспрессию VEGFR1, что может говорить о наличии других VEGF-A-независимых механизмов его регуляции.

При совместном культивировании ЭК с клетками линии THP-1 препарат «Авастин» отменял стимулирующий эффект клеток линии THP-1 в отношении длины сосудов, что может быть вызвано снижением концентрации VEGF-A, продуцируемого как ЭК, так и клетками линии THP-1 [3]. Тем не менее препарат «Авастин» не отменял стимулирующего эффекта клеток линии THP-1 в отношении экспрессии VEGFR1 и VEGFR3, что может свидетельствовать о повышенной продукции VEGF-A ЭК и клетками линии THP-1 в условиях совместного культивирования и недостаточной концентрации препарата для полного связывания и ингибирования продукции VEGF-A либо указывать на наличие VEGF-A-независимых механизмов регуляции экспрессии VEGFR1 и VEGFR3.

В монокультуре ЭК IL-1 β оказывал проангиогенное действие на ЭК, увеличивая длину сосудов и повышая экспрессию ими VEGFR1, что согласуется с данными, описанными в литературе [53]. Действие IL-1 β на ангиогенез во многом определяется его способностью повышать секрецию VEGF-A ЭК и экспрессию рецепторов к нему на ЭК [5]. Этот эффект подтверждается данными, полученными в настоящем исследовании, поскольку при добавлении препарата «Авастин» в монокультуру ЭК отмечено снижение стимулирующего эффекта IL-1 β в отношении длины сосудов. При этом препарат «Авастин» не изменял экспрессию VEGFR1 на ЭК в присутствии IL-1 β , что подтверждает прямое действие IL-1 β на экспрессию VEGFR1.

Однако в условиях сокультуры ЭК с клетками линии ТНР-1 IL-1 β снижал стимулирующее влияние ТНР-1 на длину сосудов и отменял ингибирующий эффект ТНР-1 на их количество. Активация Мф IL-1 β способствует приобретению макрофагами М2b-фенотипа; данная субпопуляция альтернативно активированных Мф характеризуется продукцией IL-10 и TNF α [2, 29, 41, 50]. IL-10 является антиангиогенным цитокином, который оказывает ингибирующее действие на ангиогенез за счет негативной регуляции синтеза проангиогенных цитокинов макрофагами, таких как IL-1 β , IL-6, а также MMP-9 и оксида азота [7, 15, 19, 32]. Таким образом, IL-1 β в сокультуре может снижать длину сосудов за счет стимуляции продукции антиангиогенных факторов макрофагами. Продукция IL-1 β макрофагами также находится под влиянием отрицательной обратной связи. Этим можно объяснить противоположный эффект IL-1 β в монокультуре ЭК и в сокультуре ЭК с клетками линии ТНР-1. При этом препарат «Авастин» в сокультуре ЭК с клетками линии ТНР-1 в присутствии IL-1 β еще больше снижал длину сосудов, образованных ЭК, что можно объяснить снижением концентрации VEGF-A в культуральной среде.

При совместном культивировании ЭК с клетками линии ТНР-1 IL-1 β повышал экспрессию ЭК VEGFR1, усиливая при этом влияние клеток линии ТНР-1 на экспрессию этого рецептора. Вероятно, в данных условиях IL-1 β сохраняет способность повышать экспрессию VEGFR1 на ЭК, обладая однонаправленным эффектом с Мф. Данный эффект IL-1 β можно также объяснить его способностью повышать продукцию ЭК VEGF-A [5]. При этом IL-1 β не влиял на экспрессию VEGFR3 на ЭК в сокультуре. Добавление препарата «Авастин» в сокультуру ЭК и ТНР-1 не отменяло стимулирующего эффекта IL-1 β в отношении экспрессии VEGFR1 ЭК, что может свидетельствовать о VEGF-A-независимом механизме регуляции экспрессии ЭК этого рецептора в условиях совместного культивирования ЭК и ТНР-1 в присутствии IL-1 β . Таким образом, IL-1 β оказывает стимулирующий эффект на экспрессию VEGFR1. Этот эффект IL-1 β не зависит от VEGF-A и, по-видимому, обусловлен прямым действием данного IL-1 β , не опосредованным секрецией VEGF-A.

IL-6 увеличивал длину сосудов в монокультуре ЭК, не изменяя при этом их количество. Полученные результаты согласуются с данными, описанными в литературе, согласно которым IL-6 является проангиогенным фактором, стимулирующим миграцию и пролиферацию ЭК, а также

регулирует секрецию ЭК bFGF, PDGF, VEGF [11, 19, 30]. В настоящем исследовании IL-6 снижал экспрессию VEGFR1 и VEGFR3 ЭК, в то время как данные литературы касательно влияния IL-6 на экспрессию VEGFR1 ЭК противоречивы: отмечено как увеличение его экспрессии [35], так и отсутствие влияния IL-6 на уровень экспрессии ЭК VEGFR1 [57]. При этом действие IL-6 не было опосредовано VEGF-A, поскольку добавление препарата «Авастин» в монокультуру ЭК не влияло на эффект, вызванный IL-6, как в отношении длины сосудов, так и в отношении экспрессии ЭК VEGFR1 и VEGFR3.

IL-6 полностью ингибировал вызванный ТНР-1 стимулирующий эффект в отношении длины сосудов, не влияя при этом на уровень экспрессии ЭК VEGFR1 и VEGFR3. Ранее установлено, что альтернативно активированные макрофаги в ответ на стимуляцию IL-6 продуцируют IL-10, обладающий антиангиогенным эффектом [23]. Таким образом, IL-6 в условиях сокультуры ЭК и ТНР-1 обладает сходным эффектом с IL-1 β на ангиогенез, вероятно, за счет стимуляции продукции антиангиогенных цитокинов макрофагами; одним из таких цитокинов может являться IL-10.

Препарат «Авастин» отменял ингибирующий эффект IL-6 на длину сосудов в сокультуре ЭК и ТНР-1. Возможно, данный эффект связан с компенсаторной продукцией проангиогенных факторов в условиях сниженной концентрации VEGF-A ЭК и клетками линии ТНР-1. В качестве таких факторов могут выступать сам VEGF-A, секретируемый в повышенном количестве, PDGF или bFGF, продукция которых поддерживается IL-6 [11, 17, 30]. Также при одновременном добавлении в систему совместного культивирования ЭК и клеток линии ТНР-1 IL-6 и препарата «Авастин» снижался уровень экспрессии VEGFR1 на ЭК; данный эффект был отмечен только в сокультуре ЭК и ТНР-1. При использовании каждого из этих индукторов по отдельности в сокультуре ЭК и ТНР-1 такой эффект не был отмечен. Таким образом, IL-6 и препарат «Авастин» лишь в комплексе способны ингибировать повышение экспрессии VEGFR1, вызванное клетками линии ТНР-1.

В монокультуре ЭК в присутствии TNF α длина сосудов увеличивалась, но их количество снижалось; это может быть связано со способностью TNF α вызывать продукцию проангиогенных факторов – IL-8, PDGF, VEGF, bFGF [1]. Снижение количества сосудов вероятно обусловлено продукцией Ang-1, участвующего в стабилизации новообразованных сосудов и обеспечивающего

неразветвляющийся ангиогенез. Ранее установлено, что TNF α способен стимулировать продукцию Ang-1 через NF- κ B-сигнальный путь [45]. Параллельно нами установлено, что TNF α снижал экспрессию VEGFR1 на ЭК в монокультуре ЭК, что согласуется с данными, описанными в литературе [37, 56]. В литературе сходный эффект TNF α отмечен в отношении экспрессии VEGFR2 и VEGFR3 [56]. В настоящем исследовании отмечено снижение экспрессии VEGFR3 ЭК в присутствии TNF α . Однако в присутствии препарата «Авастин» TNF α ингибировал экспрессию VEGFR3. В связи с этим можно предположить, что необходимым условием для снижения экспрессии VEGFR3 является недостаток свободного VEGF-A. Стоит отметить, что TNF α усиливает продукцию VEGF, в связи с чем ЭК, возможно, способны продуцировать секреторный вариант рецептора – sVEGFR1 – для удаления избытка VEGF, что может объяснить снижение уровня экспрессии VEGFR1 на поверхности ЭК.

Препарат «Авастин» не изменял эффект TNF α в отношении длины сосудов в монокультуре ЭК. Вероятно, увеличение длины сосудов в монокультуре ЭК в присутствии TNF α может быть связано со стимуляцией секреции ЭК, кроме VEGF, других проангиогенных факторов, таких как IL-8, PDGF, bFGF, Ang-1 [45]. В литературе описано противоположное действие VEGF и Ang-1: VEGF увеличивает проницаемость сосудов, участвуя в разборке межклеточных контактов, и дестабилизирует сосуды, в то время как Ang-1 обеспечивает их стабильность [34]. Таким образом, VEGF способствует формированию высокоразветвленной сети сосудов, а Ang-1 вызывает формирование более длинных сосудов с невысокой степенью ветвления [4]. По-видимому, эффект TNF α в монокультуре ЭК связан с Ang-1. При этом препарат «Авастин» отменял ингибирующее действие TNF α в отношении количества сосудов, что может свидетельствовать о роли VEGF, секрецию которого также стимулирует TNF α , в обеспечении разветвляющегося ангиогенеза.

В сокультуре ЭК и ТНР-1 TNF α снижал стимулирующий эффект ТНР-1 на длину сосудов. Возможно, в сокультуре TNF α снижает продукцию VEGF-A, а также стимулирует продукцию антиангиогенного TGF- β клетками линии ТНР-1 [48, 52]. При этом в сокультуре

ЭК и ТНР-1 TNF α не изменял экспрессию ЭК VEGFR1 и VEGFR3. Препарат «Авастин» не отменял эффект TNF α в сокультуре ЭК и ТНР-1 в отношении длины сосудов, что может быть также связано со стимуляцией продукции TGF- β клетками линии ТНР-1 и не зависит от VEGF-A. При одновременном добавлении в сокультуру ЭК и ТНР-1 TNF α и препарата «Авастин» снижалась экспрессия VEGFR1, чего, однако, не было отмечено при культивировании с каждым из индукторов по отдельности. Таким образом, в условиях совместного культивирования ЭК и клеток линии ТНР-1 IL-6 и TNF α сходным образом влияют на экспрессию VEGFR1, снижая ее лишь в условиях сниженной концентрации VEGF-A, вызванной добавлением препарата «Авастин».

Таким образом, использование препарата «Авастин» помогло установить, что при удалении VEGF-A из среды ЭК проявляют пластичность и изменяют свое поведение, вероятно, за счет продукции других цитокинов. Клетки линии ТНР-1 играют роль регулятора активности ЭК за счет секреции цитокинов, в том числе VEGF, а также благодаря контактными взаимодействиями с ЭК. Клетки линии ТНР-1 способны повышать чувствительность ЭК к VEGF за счет стимуляции экспрессии рецепторов для VEGF (VEGFR1 и VEGFR3), однако данный эффект является VEGF-A-независимым. Цитокины IL-1 β , IL-6, TNF α самостоятельно стимулируют неразветвляющийся ангиогенез, увеличивая длину сосудов. Параллельно IL-1 β увеличивает экспрессию VEGFR1 на поверхности ЭК, а IL-6 и TNF α , наоборот, снижают ее, тем самым регулируя чувствительность ЭК к VEGF. При этом эффекты данных цитокинов не зависят от VEGF-A. Действие клеток линии ТНР-1 на ангиогенез также может быть различным в зависимости от цитокинового окружения. В частности, IL-1 β , IL-6, TNF α способствуют приобретению клетками линии ТНР-1 антиангиогенных свойств, что, вероятно, не зависит от VEGF-A, а также от экспрессии его рецепторов эндотелиальными клетками. Таким образом, VEGF является важным, но не единственным фактором, контролирующим ангиогенез. В условиях недостатка VEGF либо сами ЭК, либо клетки микроокружения способны компенсировать его функциональную нагрузку за счет продукции других ростовых факторов.

Список литературы / References

1. Амчиславский Е.И., Соколов Д.И., Старикова Э.А., Фрейдлин И.С. Цитокиновый контроль ангиогенеза // Медицинская иммунология, 2003. Т. 5, № 5-6. С. 493-506. [Amtchislavsky E.I., Sokolov D.I., Starikova E.A., Freidlin I.S. Cytokine control of angiogenesis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2003, Vol. 5, no. 5-6, pp. 493-506. (In Russ.)]

2. Anderson C.F., Mosser D.M. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J. Leukoc. Biol.*, 2002, Vol. 72, no. 1, pp. 101-106.
3. Arango Duque G., Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, p. 491.
4. Benest A.V., Salmon A.H., Wang W., Glover C.P., Uney J., Harper S.J., Bates D.O. VEGF and angiopoietin-1 stimulate different angiogenic phenotypes that combine to enhance functional neovascularization in adult tissue. *Microcirculation*, 2006, Vol. 13, no. 6, pp. 423-437.
5. Berse B., Hunt J.A., Diegel R.J., Morganelli P., Yeo K., Brown F., Fava R.A. Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF-beta) and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. *Clin. Exp. Immunol.*, 1999, Vol. 115, no. 1, pp. 176-182.
6. Boiocchi L., Vener C., Savi F., Bonoldi E., Moro A., Fracchiolla N.S., Iurlo A., Deliliers G.L., Coggi G., Bosari S., Gianelli U. Increased expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 correlates with VEGF and microvessel density in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *J. Clin. Pathol.*, 2011, Vol. 64, no. 3, pp. 226-231.
7. Chatterjee P., Chiasson V.L., Bounds K.R., Mitchell B.M. Regulation of the anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10 during pregnancy. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 253. doi: 10.3389/fimmu.2014.00253.
8. Chu L.H., Lee E., Bader J.S., Popel A.S. Angiogenesis interactome and time course microarray data reveal the distinct activation patterns in endothelial cells. *PLoS ONE*, 2014, Vol. 9, no. 10, e110871. doi: 10.1371/journal.pone.0110871.
9. Desai S.B., Libutti S.K. Tumor angiogenesis and endothelial cell modulatory factors. *J. Immunother.*, 1999, Vol. 22, no. 3, pp. 186-211.
10. Dimmeler S., Zeiher A.M. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circ. Res.*, 2000, Vol. 87, no. 6, pp. 434-439.
11. Fan Y., Ye J., Shen F., Zhu Y., Yeghiazarians Y., Zhu W., Chen Y., Lawton M.T., Young W.L., Yang G.Y. Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis *in vitro*. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2008, Vol. 28, no. 1, pp. 90-98.
12. Fantin A., Vieira J.M., Gestri G., Denti L., Schwarz Q., Prykhodzhiy S., Peri F., Wilson S.W., Ruhrberg C. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood*, 2010, Vol. 116, no. 5, pp. 829-840.
13. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.*, 2003, Vol. 9, no. 6, pp. 669-676.
14. Freidlin I.S., Sheikine Y.A. Endothelial cells as targets and producers of cytokines. *Med. Immunol.*, 2001, Vol. 3, no. 4, pp. 499-514.
15. Gazzinelli R.T., Oswald I.P., James S.L., Sher A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J. Immunol.*, 1992, Vol. 148, no. 6, pp. 1792-1796.
16. Geva E., Ginzinger D.G., Zaloudek C.J., Moore D.H., Byrne A., Jaffe R.B. Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002, Vol. 87, no. 9, pp. 4213-4224.
17. Holzinger C., Weissinger E., Zuckermann A., Imhof M., Kink F., Schollhammer A., Kopp C., Wolner E. Effects of interleukin-1, -2, -4, -6, interferon-gamma and granulocyte/macrophage colony stimulating factor on human vascular endothelial cells. *Immunol. Lett.*, 1993, Vol. 35, no. 2, pp. 109-117.
18. Hsu C.W., Poche R.A., Saik J.E., Ali S., Wang S., Yosef N., Calderon G.A., Scott L., Jr., Vadakkan T.J., Larina I.V., West J.L., Dickinson M.E. Improved angiogenesis in response to localized delivery of macrophage-recruiting molecules. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 7, e0131643. doi: 10.1371/journal.pone.0131643.
19. Huang S., Xie K., Bucana C.D., Ullrich S.E., Bar-Eli M. Interleukin 10 suppresses tumor growth and metastasis of human melanoma cells: potential inhibition of angiogenesis. *Clin. Cancer Res.*, 1996, Vol. 2, no. 12, pp. 1969-1979.
20. Hughes C.S., Postovit L.M., Lajoie G.A. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*, 2010, Vol. 10, no. 9, pp. 1886-1890.
21. Jacob S.S., Shastry P., Sudhakaran P.R. Monocyte-macrophage differentiation *in vitro*: modulation by extracellular matrix protein substratum. *Mol. Cell Biochem.*, 2002, Vol. 233, no. 1-2, pp. 9-17.
22. Kalucka J., Bierhansl L., Wielockx B., Carmeliet P., Eelen G. Interaction of endothelial cells with macrophages-linking molecular and metabolic signaling. *Pflugers Arch.*, 2017, Vol. 469, no. 3-4, pp. 473-483.
23. Krakauer T., Oppenheim J.J. IL-1 and tumor necrosis factor-alpha each up-regulate both the expression of IFN-gamma receptors and enhance IFN-gamma-induced HLA-DR expression on human monocytes and a human monocytic cell line (THP-1). *J. Immunol.*, 1993, Vol. 150, no. 4, pp. 1205-1211.

24. Lvova T.Y., Stepanova O.I., Okorokova L.S., Semenov V.A., Rebezova E.A., Sel'kov S.A., Sokolov D.I. Effect of monocyte-like THP-1 cells on the formation of vascular tubes by EA.Hy926s endothelial cells in the presence of cytokines. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2015, Vol. 159, no. 1, pp. 146-151.
25. Lukacs N.W., Strieter R.M., Elnor V., Evanoff H.L., Burdick M.D., Kunkel S.L. Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1, during monocyte: endothelial cell interactions. *Blood*, 1995, Vol. 86, no. 7, pp. 2767-2773.
26. Lvova T.Y., Belyakova K.L., Sel'kov S.A., Sokolov D.I. Effect of THP-1 Cells on the formation of vascular tubes by endothelial EA.hy926 cells in the presence of placenta secretory products. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2017, Vol. 162, no. 4, pp. 545-551.
27. Lvova T.Y., Stepanova O.I., Viazmina L.P., Okorokova L.S., Belyakova K.L., Belikova M.E., Selkov S.A., Sokolov D.I. Effect of factors secreted by the placenta on phenotype of THP-1 cells cultured on a 3D scaffold. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2016, Vol. 161, no. 1, pp. 162-167.
28. Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.*, 2004, Vol. 25, no. 12, pp. 677-686.
29. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.*, 2008, Vol. 13, pp. 453-461.
30. Middleton K., Jones J., Lwin Z., Coward J.I. Interleukin-6: an angiogenic target in solid tumours. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2014, Vol. 89, no. 1, pp. 129-139.
31. Moldovan L., Moldovan N.I. Role of monocytes and macrophages in angiogenesis. *EXS*, 2005, no. 94, pp. 127-146.
32. Moore K.W., de Waal Malefyt R., Coffman R.L., O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001, Vol. 19, pp. 683-765.
33. Nagpal M., Nagpal K., Nagpal P.N. A comparative debate on the various anti-vascular endothelial growth factor drugs: pegaptanib sodium (Macugen), ranibizumab (Lucentis) and bevacizumab (Avastin). *Indian J. Ophthalmol.*, 2007, Vol. 55, no. 6, pp. 437-439.
34. Ngok S.P., Geyer R., Liu M., Kourtidis A., Agrawal S., Wu C., Seerapu H.R., Lewis-Tuffin L.J., Moodie K.L., Huveltdt D., Marx R., Baraban J.M., Storz P., Horowitz A., Anastasiadis P.Z. VEGF and Angiopoietin-1 exert opposing effects on cell junctions by regulating the Rho GEF Syx. *J. Cell Biol.*, 2012, Vol. 199, no. 7, pp. 1103-1115.
35. Nilsson M.B., Langley R.R., Fidler I.J. Interleukin-6, secreted by human ovarian carcinoma cells, is a potent proangiogenic cytokine. *Cancer Res.*, 2005, Vol. 65, no. 23, pp. 10794-10800.
36. Papetti M., Herman I.M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2002, Vol. 282, no. 5, pp. C947-C970.
37. Patterson C., Perrella M.A., Endege W.O., Yoshizumi M., Lee M.E., Haber E. Downregulation of vascular endothelial growth factor receptors by tumor necrosis factor-alpha in cultured human vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, 1996, Vol. 98, no. 2, pp. 490-496.
38. Pavlov O.V., Niauri D.A., Selutin A.V., Selkov S.A. Coordinated expression of TNFalpha- and VEGF-mediated signaling components by placental macrophages in early and late pregnancy. *Placenta*, 2016, Vol. 42, pp. 28-36.
39. Rakocevic J., Orlic D., Mitrovic-Ajtic O., Tomasevic M., Dobric M., Zlatic N., Milasinovic D., Stankovic G., Ostojic M., Labudovic-Borovic M. Endothelial cell markers from clinician's perspective. *Exp. Mol. Pathol.*, 2017, Vol. 102, no. 2, pp. 303-313.
40. Ribatti D., Nico B., Crivellato E., Vacca A. Macrophages and tumor angiogenesis. *Leukemia*, 2007, Vol. 21, no. 10, pp. 2085-2089.
41. Sato A., Ohtaki H., Tsumuraya T., Song D., Ohara K., Asano M., Iwakura Y., Atsumi T., Shioda S. Interleukin-1 participates in the classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal cord injury. *J. Neuroinflammation*, 2012, Vol. 9, p. 65
42. Schmidt T., Carmeliet P. Blood-vessel formation: Bridges that guide and unite. *Nature*, 2010, Vol. 465, no. 7299, pp. 697-699.
43. Schoppmann S.F., Birner P., Stockl J., Kalt R., Ullrich R., Caucig C., Kriehuber E., Nagy K., Alitalo K., Kerjaschki D. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am. J. Pathol.*, 2002, Vol. 161, no. 3, pp. 947-956.
44. Schubert S.Y., Benarroch A., Monter-Solans J., Edelman E.R. Primary monocytes regulate endothelial cell survival through secretion of angiopoietin-1 and activation of endothelial Tie2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2011, Vol. 31, no. 4, pp. 870-875.
45. Scott B.B., Zaratian P.F., Gilmartin A.G., Hansbury M.J., Colombo A., Belpasso C., Winkler J.D., Jackson J.R. TNF-alpha modulates angiopoietin-1 expression in rheumatoid synovial fibroblasts via the NF-kappa B signalling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, Vol. 328, no. 2, pp. 409-414.
46. Sokolov D.I., Kolobov A.V., Pecherina L.V., Kramareva N.L., Mozgovaya E.V., Kvetnoi I.M., Selkov S.A. Expression of VEGF and VEGF-R3 receptor by placental endothelial cells in health and gestosis. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2008, Vol. 145, no. 3, pp. 348-351.

47. Srabovic N., Mujagic Z., Mujanovic-Mustedanagic J., Softic A., Muminovic Z., Rifatbegovic A., Begic L. Vascular endothelial growth factor receptor-1 expression in breast cancer and its correlation to vascular endothelial growth factor α . *Int. J. Breast Cancer*, 2013, Vol. 2013, 746749. doi: 10.1155/2013/746749.
48. Sullivan D.E., Ferris M., Nguyen H., Abboud E., Brody A.R. TNF-alpha induces TGF-beta1 expression in lung fibroblasts at the transcriptional level via AP-1 activation. *J. Cell. Mol. Med.*, 2009, Vol. 13, no. 8B, pp. 1866-1876.
49. Sunderkotter C., Steinbrink K., Goebeler M., Bhardwaj R., Sorg C. Macrophages and angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.*, 1994, Vol. 55, no. 3, pp. 410-422.
50. Sutterwala F.S., Noel G.J., Salgame P., Mosser D.M. Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fcgamma receptor type I. *J. Exp. Med.*, 1998, Vol. 188, no. 1, pp. 217-222.
51. Takahashi S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. *Biol. Pharm. Bull.*, 2011, Vol. 34, no. 12, pp. 1785-1788.
52. Terasaki H., Kase S., Shirasawa M., Otsuka H., Hisatomi T., Sonoda S., Ishida S., Ishibashi T., Sakamoto T. TNF-alpha decreases VEGF secretion in highly polarized RPE cells but increases it in non-polarized RPE cells related to crosstalk between JNK and NF-kappaB pathways. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 7, e69994. doi: 10.1371/journal.pone.0069994.
53. Voronov E., Carmi Y., Apte R.N. The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis. *Front. Physiol.*, 2014, Vol. 5, 114. doi: 10.3389/fphys.2014.00114.
54. Weisser S.B., McLarren K.W., Kuroda E., Sly L.M. Generation and characterization of murine alternatively activated macrophages. *Methods Mol. Biol.*, 2013, Vol. 946, pp. 225-239.
55. Wesley R.B., 2nd, Meng X., Godin D., Galis Z.S. Extracellular matrix modulates macrophage functions characteristic to atheroma: collagen type I enhances acquisition of resident macrophage traits by human peripheral blood monocytes *in vitro*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1998, Vol. 18, no. 3, pp. 432-440.
56. Yang H., Li M., Chai H., Yan S., Zhang R., Yao Q., Chen C. Expression and regulation of neuropilins and VEGF receptors by TNF-alpha in human endothelial cells. *J. Surg. Res.*, 2004, Vol. 122, no. 2, pp. 249-255.
57. Zhang Z., Neiva K.G., Lingen M.W., Ellis L.M., Nor J.E. VEGF-dependent tumor angiogenesis requires inverse and reciprocal regulation of VEGFR1 and VEGFR2. *Cell Death Differ.*, 2010, Vol. 17, no. 3, pp. 499-512.
58. Zhao Y., Adjei A.A. Targeting angiogenesis in cancer therapy: moving beyond vascular endothelial growth factor. *Oncologist*, 2015, Vol. 20, no. 6, pp. 660-673.

Авторы:

Козырева А.Р. — лаборант-исследователь лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Львова Т.Ю. — научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Маркова К.Л. — младший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Kozyreva A.R., Researcher, Cell Interactions Laboratory, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Lvova T.Yu., Research Associate, Cell Interactions Laboratory, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Markova K.L., Junior Research Associate, Cell Interactions Laboratory, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Симбирцев А.С. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, научный руководитель ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Ищенко А.М. — к.б.н., руководитель лаборатории биохимии белка ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Сельков С.А. — д.м.н., профессор, руководитель отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Соколов Д.И. — д.б.н., заведующий лабораторией межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Simbirtsev A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Research Director, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Ischenko A.M., PhD (Biology), Head, Laboratory of Protein Biochemistry, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Selkov S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Sokolov D.I., PhD, MD (Biology), Head, Cell Interactions Laboratory, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 06.11.2019
Принята к печати 28.11.2019

Received 06.11.2019
Accepted 28.11.2019