https://doi.org/10.17116/jnevro20171178243-55

Клеточно-молекулярные механизмы регуляции ангиогенеза в головном мозге

В.М. ЧЕРТОК*, Н.В. ЗАХАРЧУК, А.Г. ЧЕРТОК

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет», Владивосток, Россия

В обзоре представлены сведения о клеточно-молекулярных механизмах регуляции ангиогенеза, связанных с сосудистым эндотелием. Согласно существующим представлениям, в регуляции ангиогенеза принимают участие активированные эндотелиальные клетки и их предшественники (прогениторные клетки), которые синтезируют и выделяют ангиогенные молекулы, отличающиеся между собой химической природой и механизмом биологического действия, но все они позволяют этим клеткам прямо или опосредованно контролировать каждый этап ангиогенеза. Для головного мозга особенно важно сбалансированное функционирование системы молекулярных стимуляторов и ингибиторов ангиогенеза, поскольку избыточное образование кровеносных сосудов, как и недостаточное их развитие, при определенных условиях ведут к быстрым и необратимым изменениям нервной ткани. Без адекватной реперфузии пораженного участка мозга недостижима постинсультная нейрорепарация, которую можно обеспечить своевременной стимуляцией ангиогенеза, а интенсификация этого процесса при опухолях, напротив, имеет неблагоприятные последствия. Рост и метастатическое распространение опухоли в значительной степени связаны с повышением уровня васкуляризации малигнизированной ткани, а блокирование ангиогенеза нередко является единственно результативным способом ограничить рост опухоли. Однако наши знания о механизмах регуляции ангиогенеза мозга на клеточно-молекулярном уровне в физиологических условиях и при патологии пока недостаточны и потому ангиогенные воздействия на тканевые мишени не всегда вызывают ожидаемый эффект.

Ключевые слова: *мозг, ангиогенез, клеточно-молекулярные механизмы регуляции, постинсультная реперфузия, опухоли головного мозга.*

The cellular and molecular mechanisms of angiogenesis regulation in the brain

V.M. CHERTOK, N.V. ZAKHARCHUK, A.G. CHERTOK

Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

This review presents the data on cellular and molecular mechanisms of angiogenesis regulation linked to the vascular epithelium. According to current conceptions, activated endothelial cells and their predecessors (progenitor cells) are involved in the regulation of angiogenesis. These cells synthesize angiogenic molecules differing by the chemical structure and mechanism of biological effect and allowing a direct or indirect control over each stage of angiogenesis. Both the excess and insufficient angiogenesis can lead to fast and irreversible changes in nervous tissue under certain conditions. For this reason, the balance in the system of molecular stimulators and inhibitors of angiogenesis is especially important for brain function. Without adequate reperfusion of an affected brain area the post-stroke neuroreparation, which can be provided with timely stimulation of angiogenesis, is unattainable and the intensification of this process in tumors, on the contrary, has adverse consequences. Growth of a tumor and its metastatic spread are substantially associated with an increase in the level of tumor tissue vascularization, and blocking angiogenesis is often the only productive way to limit the growth of a tumor. However our knowledge of mechanisms of angiogenesis regulation in the brain on the cellular and molecular level in physiological and pathological conditions is still insufficient, and, therefore, the influence of angiogenic factors on tissue targets do not always cause the expected effects.

Keywords: *angiogenesis, cellular and molecular mechanisms of regulation, post stroke reperfusion, brain tumors.*

Определенный прогресс, достигнутый в последние годы в изучении ангиогенеза в головном мозге, во многом обусловлен появлением новых данных о решающей роли эндотелия в этом процессе [1]. Согласно существующим представлениям, в регуляции ангиогенеза принимают участие сосудистые эндотелиоциты и их предшественники (прогениторные клетки) [2]. В ответ на действие индукторов ангиогенеза эндотелиоциты выделяют ангиогенные молекулы, значительно отличающиеся между собой химической природой и механизмом биологического действия, но которые позволяют этим клеткам прямо или опосредованно контролировать каждый этап ангиогенеза [3].

Все преобразования, проходящие в стенке сосудов в процессе ангиогенеза, жестко регулируются

© Коллектив авторов, 2017

*e-mail: chertokv@mail.ru

клеточно-молекулярными механизмами, связанными с эндотелием. Они обеспечивают последовательное включение стимуляторов или ингибиторов ангиогенеза, которые запускают или тормозят образование новых кровеносных сосудов [4]. Для головного мозга особенно важно сбалансированное функционирование этой системы, поскольку избыточное образование кровеносных сосудов и недостаточное их развитие одинаково ведут к появлению быстрых и необратимых изменений нервной ткани. Неоднократно отмечалось, что постинсультная нейрорепарация недостижима без адекватной реперфузии пораженного участка головного мозга, которую можно обеспечить своевременной стимуляцией ангиогенеза, восстановлением целостности эндотелиальной выстилки и функций гематоэнцефалического барьера [5]. Интенсификация ангиогенеза, наблюдающаяся при злокачественных новообразованиях, напротив, имеет неблагоприятные последствия. Рост и метастатическое распространение опухоли в значительной степени обусловлены усилением ее васкуляризации. Клинические исследования показали, что глиомы, известные высокой степенью злокачественности, являются высоковаскуляризованными образованиями, а вещества, тормозящие ремоделирование сосудистой сети, приостанавливают рост опухоли [6]. В связи с этими данными антиангиогенная терапия отдельных видов опухолей головного мозга приобретает все больше сторонников.

Механизмы ангиогенеза

Ангиогенез представляет собой процесс образования новых капилляров в организме как до рождения организма, так и после него, из уже существующих сосудов. Как правило, в ангиогенезе выделяют 4 основные стадии: 1) активацию эндотелиоцитов с протеолитическим разрушением базальной мембраны и межклеточного матрикса матриксными металлопротеиназами, коллагеназами IV типа и активаторами плазминогена; 2) миграцию и прикрепление эндотелиальных клеток; 3) их пролиферацию; 4) формирование капиллярных трубок с новой базальной мембраной, которые являются первыми кровеносными сосудами в примитивной капиллярной сети.

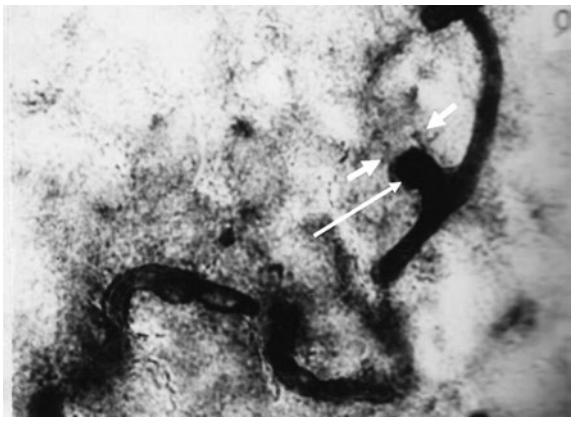
Во взрослом организме большинство кровеносных сосудов находится в состоянии покоя, тем не менее клетки эндотелия сохраняют способность к быстрому делению, что составляет основу для инициации ангиогенеза в том случае, если в организме создаются необходимые условия. Обычно отмечаются три механизма, запускающие пролиферацию эндотелиоцитов при ангиогенезе: 1) действие индукторов ангиогенеза (гипоксия, ишемия, опухоль, воспаление и т.д.); 2) проангиогенные факторы, действие которых на рецепторы клеточной поверхности или внеклеточного матрикса вызывает активацию эндотелиоцитов; 3) нарушение взаимодействия клетка—клетка, клетка—субстрат, в результате чего возникают миграция и репликация эндотелиальных клеток. Пока не меняются эти взаимодействия, клетки не отвечают даже на очень мощные митогенные стимулы (освобождение митогенов из базальной мембраны сосудов может быть реализовано с помощью опухолевых протеаз или гепариназ) [4, 7, 8].

Под влиянием индукторов ангиогенеза эндотелиоциты выходят из свойственного им состояния покоя и начинают интенсивно делиться — скорость их удвоения возрастает примерно в 100 раз. Активированные эндотелиальные клетки синтезируют и продуцируют проангиогенные факторы — вещества, вызывающие ангиогенные изменения как образующих их клеток, так и внеклеточного матрикса [8]. В области формирования нового капиллярного ростка существующий сосуд расширяется, в нем ослабляются межклеточные связи, увеличивается проницаемость. Прекращение действия этих веществ возвращает эндотелиальные клетки в состояние покоя. Этот процесс запускается эндотелием опосредованно через фактор роста тромбоцитов (platelet-derived growth factor — PDGF) [9].

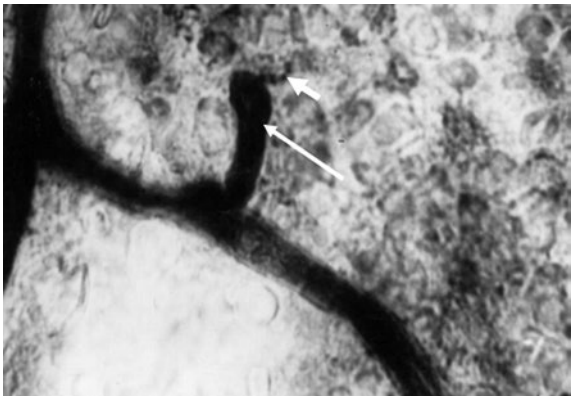
Проангиогенные факторы, некоторые из которых являются митогенами и хемоаттрактантами не только для эндотелиоцитов, но и для мезенхимных клеток, обеспечивают соответствующие преобразования и других элементов сосудистой стенки — перицитов, гладкомышечных клеток, фибробластов, внеклеточного матрикса [10].

Формирование сосудистой стенки при ангиогенезе. Воздействие проангиогенных факторов приводит к спраутингу, морфологическим выражением которого является хемотаксическое вытягивание отростков активированных эндотелиальных клеток по направлению к источнику раздражения, в результате чего формируются капиллярные ростки или «почки» **(рис. 1, а)**. Впоследствии это образование приобретает форму тяжа с концевой нитью **(см. рис. 1, б)**. Под электронным микроскопом боковое ответвление капилляра представляет собой довольно сложную в морфологическом отношении структуру, состоящую из типичного микрососуда и отходящего от него клеточного тяжа **(рис. 2)**. В месте отхождения последнего базальная мембрана редуцирована. Внутри тяжа определяются несколько не связанных между собой камер, а в цитоплазме эндотелиальных клеток содержатся многочисленные рибосомы, митохондрии, элементы эндоплазматической сети, что характерно для «молодых» пролиферирующих клеток [7, 11]. Снаружи все это образование окружено отростками астроцитов.

Эндотелиальные клетки, входящие в состав таких ответвлений, отличает высокая пролиферативная активность (индекс ядер, меченных по ДНК, до-



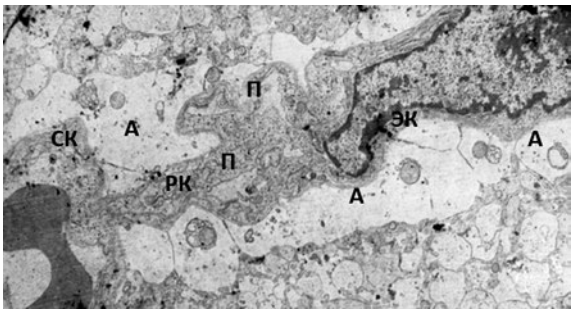
а



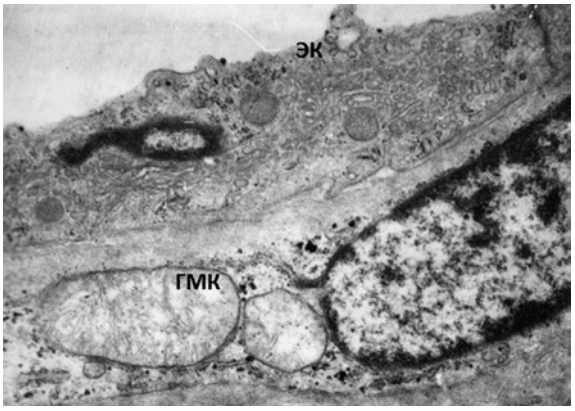
б

***Рис. 1.* Формирование ростка капилляра в процессе ангиогенеза.**

а, б — боковые ответвления капилляров (длинная стрелка) с концевой нитью (короткая стрелка). Метод Гомори. Об. 20×, ок. 10×.



а



б

***Рис. 2.* Ультраструктурная организация ростка капилляра (а) и мышечной оболочки формируюшегося сосуда (б).**

СК — сформированный капилляр; РК — росток капилляра; ЭК — эндотелиальная клетка; П — просвет формирующегося капилляра; А — ножки астроцитов; ГМК — гладкомышечная клетка. а — ув. 10 000; б — ув. 18 000.

стигает 4%), что способствует удлинению капиллярных ростков. В тяжах эндотелиальных клеток за счет их интенсивной вакуолизации или формирования внеклеточных каналов образуется просвет, и вытянутые тяжи клеток превращаются в самостоятельные капиллярные трубки. Вначале рост клеток происходит в направлении, перпендикулярном существующему сосуду, ближе к его венозному отделу там, где выше митотическая активность эндотелиоцитов. Из окружающего интерстиция начинается миграция к капиллярным росткам клеток, превращающихся в перициты, которые затем окутываются базальной мембраной [12, 13]. Указанные процессы дополняются репродукцией эндотелиоцитов позади фронта мигрирующих эндотелиальных клеток, появлением на их базальной поверхности большого числа отростков. Эндотелиальные тяжи сосудов направляются навстречу друг другу, сближаются и сливаются, а через некоторое время плазма крови начинает циркулировать по вновь образованным узким каналам капиллярной сети. Постепенно эти каналы расширяются настолько, что приобретают способность пропускать клетки крови. Дальнейшие перестройки, проходящие в процессе формирования дефинитивной сосудистой сети (дифференцировка, специализация, ремоделирование), находятся под контролем проангиогенных факторов — молекулярных регуляторов ангиогенеза, гемодинамических факторов и т.д.

Образование почек роста в головном мозге наблюдается на протяжении всего онтогенеза, но особенно часто их можно видеть в плодном, раннем постнатальном, пожилом и старческом возрасте [7, 14, 15]. Развитие кровеносной системы органа в пренатальном онтогенезе обязательно включает в себя этап ангиогенеза, при котором структура первичного сосудистого сплетения значительно усложняется за счет увеличения числа ветвлений капилляров и его реорганизации в высокоорганизованную сосудистую сеть [7, 16]. Впрочем, значительное число капиллярных ростков останавливается в своем развитии, а затем полностью исчезает. Редукция ростков наблюдается в любом возрасте, но в старости встречается чаще, т.е. возможности ангиогенеза

у людей старших возрастных групп полностью не реализуются. Процесс обратного преобразования почек прослеживается последовательно и с большой наглядностью: они теряют концевые волоконца, уменьшаются в размерах вплоть до полного слияния со стенкой материнского ствола [7, 14]. Некоторые ростки капилляров на промежуточных стадиях инволюции превращаются в полностью гиалинизированные образования. Сокращение количества почек в старости коррелирует с уменьшением ветвлений капилляров и плотности сосудистого русла, внутримозгового кровотока и потребления кислорода нейронами [1, 17]. Все это может быть связано со снижением активности нервных клеток, отмиранием части из них и нарушением нейрососудистой сигнализации в гематоэнцефалическом барьере.

Вновь образованные сосуды — широкие и извитые, с проницаемым эндотелием, обеспечивают интенсивный трансваскулярный транспорт макромолекул альбумина, диапедез лейкоцитов и эритроцитов. Высокий уровень обмена веществ через стенки развивающихся сосудов способствует пролиферации окружающих тканей, что в свою очередь стимулирует рост и ремоделирование сосудов. По мере их созревания проницаемость эндотелия уменьшается, а связь между стенкой сосудов и окружающими тканями ослабляется, подавляя появление новых сосудов [18]. Если повышенная проницаемость сосудов сохраняется более продолжительное время, то это может привести к развитию отека мозга.

В процессе ангиогенеза эндотелий продуцирует ряд факторов роста, их рецепторов и лигандов, которые контролируют основные этапы формирования клеточного состава стенки сосудов [3]. Среди большого количества проангиогенных веществ наибольший интерес у исследователей вызывают семейство сосудистых эндотелиальных факторов роста, семейство факторов роста фибробластов, трансформирующий фактор роста, фактор некроза опухоли и некоторые другие растворимые полипептиды, которые оказались весьма эффективными регуляторами новообразования капилляров [19]. Приоритетное место среди этих веществ, несомненно, принадлежит фактору роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor — VEGF), которому обычно отводится ключевая роль в ангиогенезе [8, 20]. Его уровень повышен только в тех тканях, где активно протекает ангиогенез, а рецепторы экспрессируются преимущественно на эндотелиоцитах близлежащих кровеносных сосудов. Каскад сигнализации, связанный с VEGF, оказывает непосредственное воздействие на клетки эндотелия, стимулируя их рост в условиях *in vitro* [21].

Геном млекопитающих кодирует пять членов семейства VEGF, но наибольшее значение в образовании кровеносных сосудов имеют VEGF-A и VEGF-B. Первый из них существенно повышает проницаемость эндотелия, играет важную роль в миграции и пролиферации эндотелиальных клеток, второй — в деградации внеклеточного матрикса, обеспечении барьерной функции эндотелия [8, 22]. Все изоформы VEGF с разной аффинностью связываются с одним, двумя или тремя рецепторами группы тирозинкиназ (VEGFR): fit-1 (VEGFR-1), KDR/flk-1 (VEGFR-2) и flt-4 (VEGFR-3). Они локализованы на поверхности эндотелиальных клеток или включены во внутриклеточную сигнализацию. Главным рецептором VEGF-сигнализации считается VEGFR-2, который вовлечен в процессы выживания эндотелиальных клеток и апоптоз [8]. В нормальных условиях рецепторы группы VEGFR не активны, но их экспрессия происходит под действием индукторов ангиогенеза, что приводит к включению многочисленных внутриклеточных сигнальных каскадов, индуцирующих провоспалительные реакции и запускающих ангиогенез.

VEGFR, долгое время считавшиеся принадлежностью исключительно эндотелиальных клеток, были обнаружены и на поверхности гладкомышечных клеток сосудов, что позволило рассматривать VEGF в качестве непосредственного регулятора вазомоторики [22]. Развитие гладкомышечных клеток в сосудах регулируется также представителями семейства ангиопоэтинов [23]. Ангиопоэтин-1 усиливает ангиогенез, ангиопоэтин-2 связывается с теми же рецепторами, но является его антагонистом. Под влиянием ангиопоэтина-2 происходит атрофия сосудов, а при его отсутствии наблюдается активизация ангиогенеза. В ремоделировании сосудистой сети доказано участие большой группы интерлейкинов (IL-1, IL-6, IL-10, IL-18) [24]. Однако ключевую роль в этом процессе играет тромбоцитарный фактор роста, который обеспечивает взаимодействие между секретирующими его клетками эндотелия, перицитами и гладкомышечными клетками [25]. Эта регуляторная молекула оказывает митогенное действие на гладкомышечные клетки, вызывая их пролиферацию, направленную миграцию и инкорпорацию в стенку сосуда. Однако для надлежащего формирования стенки сосуда важно, чтобы продукция данного вещества осуществлялась именно клетками эндотелия. В тех случаях, когда его выработка в клетках эндотелия сокращается, количество перицитов, участвующих в образовании капилляров, уменьшается, а в стенке сосудов появляются многочисленные дефекты [26].

Взаимодействие между эндотелиоцитами и перицитами в ангиогенезе устанавливается очень рано. Роль перицитов на начальном этапе формирования нового сосуда заключается в укреплении нежных и весьма ранимых почек роста [12, 13]. Перициты предупреждают также выход в соединительную ткань клеточных элементов и плазмы крови, оказывают стабилизирующее действие на вновь образо-

ванные сосуды и останавливают их рост [27, 28]. Появление перицитов в дубликатуре базальной мембраны, граничащей с эндотелием, и накопление в ней белков внеклеточного матрикса ингибируют пролиферацию и миграцию клеток эндотелия, способствуют ускорению созревания сосуда и его переходу в покоящееся состояние [29].

С формированием в ангиогенезе артериол в стенку первичных капилляров встраиваются гладкомышечные клетки. Однако объемная плотность миофибрилл в них почти в 3 раза меньше, чем в зрелых клетках [7, 11]. Своим строением и функциональными свойствами миофибриллы также значительно отличаются от сократительных структур дефинитивных сосудистых миоцитов, что не позволяет их рассматривать лишь в качестве элемента вазомоторики. В экспериментальных исследованиях последних лет [30] было показано, что гладкомышечные клетки во вновь образованных артериях обладают полифункциональными свойствами и отличаются фенотипическими характеристиками. Сосудистые миоциты очень динамичны, а их фенотип зависит от комбинированного взаимодействия различных элементов периваскулярной микросреды. В новообразованных сосудах они не только обеспечивают формирование мышечной оболочки, но и секрецию протеина внеклеточного матрикса.

Пролиферацию и дифференцировку гладкомышечных клеток на всех этапах формирования сосудистой стенки непосредственно контролируют эндотелийзависимые механизмы. Некоторые вещества, синтезируемые эндотелиальными клетками (оксид азота, эндотелин), а также IL-1в, способны менять фенотип гладкомышечных клеток. Снижение концентрации оксида азота в церебральных артериях ведет к изменению фенотипа этих клеток и их сократительной способности. Эндотелин после острой ишемии оказывает на гладкомышечные клетки митогенное действие, выступая как ростовой фактор, в результате чего они частично утрачивают контрактильные свойства и влияние на тонус сосудов. Все это приводит к снижению реакции резистивных сосудов на метаболические сдвиги и нарушению органного гомеостаза, что в свою очередь стимулирует рост новых сосудов.

Ведущие эндотелиальные клетки. Однако не все клетки эндотелия одновременно и в равной степени реагируют на ангиогенный стимул, что позволяет упорядочить процесс ангиогенеза. Достаточно давно было замечено, что сосудистый эндотелий представляет собой неоднородное образование, включающее клетки, часто расположенные в непосредственной близости, но заметно отличающиеся друг от друга структурными и функциональными характеристиками [11, 31]. Некоторые из этих клеток, обладающие, как правило, высокой энзиматической активностью, участвуют в формировании почек роста, а на их поверхности появляются характерные цитоплазматические отростки, которые вытягиваются в направлении ангиогенного стимула [14]. Такие «ведущие эндотелиальные клетки» (ВЭК), известные в англоязычной литературе как «tip cell», при образовании новых сосудов занимают лидирующее положение [27].

Установлен механизм, с помощью которого для новообразования капилляров отбираются лишь некоторые из клеток эндотелия. Экспериментальным путем было показано, что отбор ВЭК контролируется рецепторами семейства Notch и их трансмембранными лигандами Dll4 (delta like ligand 4) [32]. Причем экспрессия Dll4 и Notch1 в той части сосуда, где происходит активация ангиогенеза, распределена между клетками эндотелия мозаично, а характеристики, свойственные ВЭК, приобретают в основном те клетки, у которых отсутствует экспрессия Notch1. ВЭК занимают лидирующие позиции при образовании новых сосудов, в том числе и благодаря тому, что тонко реагируют на градиент VEGF-A, задающего направление их миграции, и возглавляют продвижение растущего капилляра. Под действием VEGF-A у ВЭК кардинально изменяется фенотип: они приобретают два важных свойства — инвазивность и способность к перемещению [27]. Одновременно разрушаются контактные взаимодействия между ВЭК и окружающими клетками эндотелия. У ВЭК появляются филоподии, активируются протеазы, вызывающие частичную деструкцию базальной мембраны. В этих процессах принимает участие Rac1, повышающий активность SDF-1 — одного из наиболее мощных ангиогенных цитокинов, который опосредует миграцию и созревание эндотелиоцитов, а также восстановление поврежденного эндотелия [24].

С передачей внутриклеточного сигнала в эндотелии непосредственно связан VEGF-A. Индуцируя экспрессию Dll4 и его рецепторов Notch, VEGF-A обеспечивает различное поведение клеток эндотелия, которые подверглись воздействию ангиогенных стимулов. После того как произошел отбор и началась миграция ВЭК, формирование капилляров осуществляется за счет пролиферации и продвижения других эндотелиальных клеток. Пролиферация клеток, находящихся в новом тяже капилляра, стимулируется воздействием VEGF-A на внутриклеточные сигнальные рецепторы VEGFR-2, которые, кроме того, вовлечены в процессы выживания эндотелиальных клеток и апоптоз [33]. В клетках эндотелия, экспрессирующих Notch1, активация лигандом Dll4-зависимой сигнализации, связанной с этим рецептором, предотвращает переход клеток в активное состояние и тем самым ограничивает появление избыточного количества ВЭК [32]. Подавление активного состояния клеток эндотелия в результате стимуляции Dll4/Notch1-ассоциированной

передачи внутриклеточного сигнала происходит, по-видимому, за счет уменьшения их чувствительности к воздействию VEGF-A. Понижение экспрессии Dll4 или блокирование Notch1-зависимой сигнализации интенсифицируют процесс образования ВЭК, что приводит к обильному ветвлению кровеносных сосудов и значительному уплотнению органной сосудистой сети [34].

Высказывается предположение, что ВЭК и остальные клетки эндотелия растущего капилляра представляют собой две различные субпопуляции клеток [35]. Источником образования ВЭК в сосудах может быть отдельная группа эндотелиальных клеток-предшественников, дифференцировка которых регулируется геном *Hex* [2]. Однако пока не удается выяснить, являются ли отличия между ними генетически запрограммированными или же представляют собой результат временной адаптации, связанной с особенностями развития капиллярной сети.

Эндотелиальные клетки-предшественники, известные также как эндотелиальные прогениторные клетки (endothelial progenitor cells — ЭПК), включают разнородную популяцию клеток, способных дифференцироваться исключительно в эндотелиальные клетки [2, 36]. ЭПК обладают характеристиками как стволовых, так и зрелых эндотелиальных клеток.

Первая публикация о наличии ЭПК костномозгового происхождения в периферической крови вышла в конце прошлого века [37]. Для идентификации ЭПК авторами этой работы было использовано 2 маркера: гемопоэтических предшественников (CD34) и зрелых эндотелиальных клеток (VEGFR-2). Эндотелиальные предшественники костномозгового происхождения — главные кандидаты на поддержание и восстановление сосудов, характеризуются триадой маркеров: CD34, CD133 и VEGFR-2. Наиболее примитивным маркером гемопоэтических клеток является CD133, экспрессия которого в отличие от CD34 установлена только на незрелых типах клеток. Позднее была выделена популяция незрелых эндотелиальных клеток из циркулирующих мононуклеарных клеток, которые также могут дифференцироваться в эндотелиоциты, но не экспрессируют CD34 [38]. В связи с этими открытиями появились основания считать, что костный мозг — не единственный орган, в котором находятся клетки-предшественники, дифференцирующиеся в зрелые эндотелиальные клетки сосудов. По некоторым данным, около 70% ЭПК, циркулирующих в крови, имеют некостномозговое происхождение [2, 36]. ЭПК содержатся в кишечнике и печени, а при определенных условиях культивирования мононуклеарные клетки селезенки приобретают эндотелиальный фенотип, свойственный первичной сосудистой сети *in vitro*. Иначе говоря, ЭПК, подобно эмбриональным ангиобластам, могут участвовать в появлении сосудов во взрослом организме, в связи с чем новообразование капилляров в дефинитивном органе можно представить как монтаж эндотелия из отдельных ЭПК, одновременно собирающихся в единую систему.

ЭПК играют заметную роль в эндогенной сосудистой репарации в мозге, эндотелиальной интеграции и гомеостазе, противодействуют факторам риска деструкции эндотелия и эндотелиальной дисфункции [39]. В этом отношении ЭПК, циркулирующие в периферической крови, представляют большой интерес в качестве диагностического и прогностического биомаркера сердечно-сосудистых и воспалительных заболеваний. Сокращение плазменного титра этих клеток наблюдается при сахарном диабете, курении, ожирении, атеросклерозе и коррелирует с повышенным риском инсульта, инфаркта миокарда, гипертонической болезни [19, 36, 39]. Прекращение курения приводит не только к восстановлению уровня циркулирующих ЭПК, но и к эндотелиальной функции церебральных артерий. Однако клиническое применение ауто-ЭПК лимитировано их малым количеством в крови: 2—3 ЭПК/мл. Поэтому в последнее десятилетие вырос интерес к искусственному получению ЭПК из доступных резервов, прежде всего из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток. К примеру, первичная культура этих клеток, выделенная из вартонова студня пупочного канатика, обогащена ЭПК в значительно большей степени, чем аспират костного мозга взрослого человека.

Изучение процессов ангиогенеза *in vivo* и *in vitro* позволило идентифицировать «ранние» и «поздние» ЭПК. Эти две субпопуляции прогениторов имеют не только разный фенотип, но и отличаются интенсивностью пролиферативных процессов и ролью в неоангиогенезе [2, 36]. Ранние ЭПК, полученные из моноцитарных клеток, имеют низкую пролиферативную активность и экспрессируют маркеры, характерные для эндотелиальных клеток. Они продуцируют ряд ангиогенных факторов (VEGF, SDF-1, IL-8, IL-18, IL-10), которые увеличивают пролиферацию и миграционную активность поздних ЭПК. Ранние ЭПК иногда могут встраиваться в монослой эндотелия, но неэффективны в неоангиогенезе, поскольку не обеспечивают достаточную перфузию тканей *in vivo* [35, 36]. Поздние ЭПК обладают большим пролиферативным потенциалом, они способны внедряться в уже сформированные сосуды и играют ключевую роль в неоангиогенезе, непосредственно участвуя в образовании сосудистой сети *in vivo*. В связи с этим поздние ЭПК считаются «истинными» ЭПК. Их введение в ишемизированные ткани приводит к восстановлению кровоснабжения и усилению регенерации [4, 40, 41]. Тем не менее и фенотип, и функциональная принадлежность ЭПК

могут меняться в зависимости от источника происхождения.

Механизмы направленной миграции и рекрутинг ЭПК изучены пока недостаточно. Предполагается, что мобилизованные действием ангиогенных факторов эти клетки из костного мозга перемещаются в периферическую кровь, а затем к месту деструкции сосудистого эндотелия, где дифференцируются в зрелые эндотелиоциты [24, 41]. Вероятнее всего, мобилизация осуществляется под воздействием паракринных и эндокринных сигналов, поступающих из эндотелиальных клеток уже существующих сосудов. Эффективным мобилизатором ЭПК является VEGF. При повреждении тканей, когда необходимо образование новых кровеносных сосудов, VEGF опосредует пролиферацию, дифференцировку и хемотаксис этих клеток [25]. Быстрое повышение уровня циркулирующего VEGF ведет к увеличению содержания NO и активации MMP-9, что приводит к вазодилатации и стимуляции ряда лиганд-рецепторных пар. Несомненно, важнейшим фактором хоминга стволовых клеток является цитокин SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) и его CXC-хемокиновые рецепторы 4 (CXCR-4), которые участвуют во всех механизмах восстановления эндотелия при его поражении. Указанные факторы обеспечивают миграцию стволовых клеток в область поражения, а блокирование CXCR-4 останавливает этот процесс [42]. Увеличить миграцию стволовых клеток из костного мозга в периферическую кровь можно путем применения ряда индуцирующих агентов: G-CSF и GM-CSF, зимозана, статинов, хемокинов (SDF-1, IL-8, IL-10, IL-18), ростовых факторов (VEGF), антагониста CXCR-4 [36].

Хоуминг стволовых клеток в очаг повреждения имеет сходство с воспалительным ответом. Прогениторные клетки взаимодействуют с поврежденным монослоем эндотелия подобно тому, как лейкоциты взаимодействуют с активированными эндотелиальными клетками. Молекулы адгезии, вовлеченные в движение и адгезию лейкоцитов, рассматриваются как ключевые регуляторы хоминга ЭПК, т.е. обеспечивают процесс перемещения циркулирующих клеток к органам-мишеням, например в зону ишемии после инсульта или инфаркта миокарда [42]. Начальная стадия хоминга ЭПК в очаг повреждения включает адгезию и трансмиграцию прогениторных клеток через эндотелиальный монослой [43]. Селектины (P-selectin, E-selectin) обусловливают начальный этап этого процесса, интегрины (β2-integrins), молекулы адгезии (ICAM-1, VCAM-1) способствуют адгезии и трансмиграции ЭПК к поврежденному эндотелиальному монослою, катепсины и матриксные металлопротеиназы-2 и -9 участвуют в деградации матрикса и инвазии ЭПК. Прогениторные клетки начинают дифференцироваться в эндотелиальные клетки еще по мере движения к поврежденным тканям. Инициируют этот каскад VEGF, SDF-1 и механическое давление, оказываемое током крови [44]. ЭПК направленно мигрируют из тяжей капилляров, формируя новый тяж вслед за ВЭК [27].

Ангиогенез при инсульте и постишемической реперфузии головного мозга

В настоящее время одним из основных направлений терапии при ишемическом инсульте считается реперфузия [4, 39]. Использование реперфузионных технологий позволяет существенно улучшить мозговые функции у больных, перенесших инсульт, не только в остром, но и в восстановительном периоде. В первые часы после развития ишемического инсульта в пострадавшей области головного мозга находятся сосуды и нейроны с разной степенью структурно-функциональных изменений, выраженность которых, как и нарушение кровотока, снижается по направлению от ядра инфаркта к периферическим зонам ишемической полутени (пенумбры) [1, 45, 46]. Поэтому многие современные технологии направлены на активизацию ангиогенеза — одного из важнейших элементов, обеспечивающих постишемическую реперфузию мозга. Проангиогенная терапия способствует усилению кровообращения, уменьшению размера инфаркта и восстановлению сосудисто-нервных взаимоотношений в области ишемической полутени [47].

Пенумбра — зона активного ангиогенеза и нейрогенеза. Имеются данные, что повышение плотности микрососудов в этой зоне увеличивает вероятность благоприятного исхода при ишемическом инсульте [48]. В тех случаях, когда этого не происходит, прогноз для пациентов серьезно ухудшается. Ангиогенез в постинсультном периоде играет двоякую роль: с одной стороны, относительно высокая плотность сосудов в этой зоне способствует увеличению перфузии, что стимулирует нейрогенез и улучшает функциональный прогноз ишемического инсульта, с другой — развитие сосудистой сети и интенсификация кровотока обеспечивают скорейшее выведение некротических масс из очага поражения [46, 47].

Ишемия и гипоксия индуцируют васкуляризацию и ремоделирование сосудистых сетей. Данные процессы могут начаться уже через 12—24 ч после инсульта и сохраняются в течение нескольких недель [49]. Но так происходит не всегда. Пациенты, у которых после инсульта развивается деменция, в первую очередь страдают от нарастающей гипоксии, связанной с дефицитом кровоснабжения прилегающих областей коры. Вероятность того, что ангиогенез может улучшить постишемическую реперфузию и функции нейронов при ремоделировании сосудистой сети мозга, во многом зависит от своевременно начатой терапии, поскольку деградация области ишемической полутени наступает довольно

быстро. Утрата эффективного взаимодействия между сосудистыми и нервными элементами вызывает паренхиматозные повреждения на площади, значительно превышающей очаг поражения. Вместе с тем можно удержать зону пенумбры в деятельном состоянии, если вовремя задействовать эндогенные механизмы пластичности и ремоделирования сосудистой сети [48].

Недостаток кислорода, возникающий в мозге при ишемическом инсульте, повышает секреторную активность эндотелиоцитов и рост капилляров. Активированные эндотелиоциты усиливают синтез и выделение проангиогенных молекул: индуцируемого гипоксией фактора-1, PVLAP (plasmalemma vesicle-associated protein), эстрогена, оксида азота, способствующих структурным и функциональным перестройкам эндотелия, характерным для первой фазы ангиогенеза [50]. Увеличение продукции факторов роста и в первую очередь VEGF стимулирует процессы новообразования сосудов, обеспечивающих постишемическую реперфузию мозга. Экспериментальным путем установлено, что внутрижелудочковое введение рекомбинантного человеческого VEGF в первые 48 ч после фокальной ишемии приводит к увеличению плотности капилляров в зоне пенумбры и уменьшению размеров очага инфаркта мозга [51]. Транскрипцию гена *Vegf* и его рецепторов при гипоксии активирует индуцируемый гипоксией фактор-1α (HIF-1α). Этот высококонсервативный транскрипционный фактор регулирует экспрессию более чем 200 генов, играющих важную роль в формировании устойчивости мозга к недостатку кислорода как у позвоночных, так и беспозвоночных животных [52, 53]. Под влиянием HIF-1α происходит усиление синтеза таких гликолитических ферментов, как фосфофруктокиназа, пируваткиназа, фосфоглицераткиназа, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, что обеспечивает усиление образования аденозинтрифосфата (АТФ) в результате анаэробного метаболизма глюкозы. С другой стороны, HIF-1α усиливает экспрессию мембранных транспортеров глюкозы (GLUT1 и GLUT3), способствуя дополнительному включению глюкозы в гликолитический путь. К HIF-1α-зависимым генам относятся также гены эндотелиальной NO-синтазы и циклооксигеназы-2, которые обладают протективными эффектами, в основном за счет вазодилатации и улучшения церебрального кровотока [54, 55].

При снижении парциального давления кислорода в нервной ткани под регулирующее влияние HIF-1α попадают активаторы и ингибиторы плазминогена (PA-u, PA-t, PA-1-1), запускается система протеолиза, связанная с ремоделированием внеклеточного матрикса, обеспечивается защита клеток от апоптоза, индуцированного фактором некроза опухоли [50]. Некоторые генетические факторы, среди которых *c-myb, ras, src*, также повышают в этих случаях экспрессию молекулярных регуляторов ангиогенеза [24]. В реакции клеток на гипоксию важная роль принадлежит и представителям семейства Rho ГТФазы, прежде всего Rac-1 [50, 52]. Под контролем Rac-1 в эндотелиоцитах проходит ряд важных событий, во многом определяющих характер ответа клеток на действие этого фактора: 1) экспрессия HIF-1α эндотелиоцитами; 2) изменение эндотелиальных белков цитоскелета; 3) продукция SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) с экспрессией его CXCR; 4) активация матриксных металлопротеиназ, участвующих в преобразовании внеклеточного вещества.

Ишемия и гипоксия головного мозга при определенных условиях могут приводить как к повреждающим, так и к протективным последствиям. Не так давно было установлено, что защитную функцию при ишемическом инсульте могут выполнять периваскулярные нервные волокна [30]. Нервные волокна различной медиаторной принадлежности были обнаружены с помощью гисто- и иммуногистохимических методов, электронной микроскопии в окружении пиальных и внутримозговых артерий, а также в медиоадвентициальной области [56—58]. Регулируя вазомоторику, сосудистые нервы стимулируют процессы ангиогенеза, способствуя уменьшению размеров очага поражения мозга. Повреждение этих волокон может привести к нарушению регуляции внутримозгового кровотока и перфузии нервной ткани, следствием чего являются локальные изменения метаболических процессов как во время, так и после острой ишемии [59]. Источником образования вазомоторных нервных волокон являются ядра [60] и небольшие скопления межъядерных нервных клеток [61, 62], расположенные преимущественно в каудальной части ствола мозга, что предполагает возможность центральной регуляции ангиогенеза.

С вазомоторной иннервацией мозга структурно и функционально связаны тучные клетки, гранулы которых содержат биологически активные вещества и протеолитические ферменты (гистамин, гепарин, триптазу и пр.), стимулирующие ангиогенез [57, 63—65]. Гистамин оказывает митогенный эффект на эндотелиальные клетки, который реализуется через Н1-рецепторы, а гепарин стимулирует миграцию этих клеток, тормозит пролиферацию перицитов и сосудистых миоцитов, снижающих пролиферативную активность эндотелия. Предполагается также, что гепарин может усиливать ангиогенную активность того или иного фактора роста, стимулируя его накопление в гранулах тучных клеток. Протеолитические ферменты, выделяющиеся из гранул тучных клеток в процессе секреции, разжижают интерстиций, механически облегчая рост сосудов [65]. В составе интерстициального матрикса находится ряд

веществ (фибронектин, коллаген интерстициального типа, эластин), обладающих хемотаксической активностью для эндотелиальных клеток, существенно повышая их мобилизацию и дифференциацию в процессе ангиогенеза.

Весьма перспективным направлением в лечении больных с инсультом является разработка технологий воздействия на ЭПК, циркулирующие в периферической крови. Неоднократно отмечалось, что увеличение концентрации этих клеток коррелирует с улучшением состояния больных в восстановительном периоде ишемического инсульта [39, 66]. Снижение плазменного титра ЭПК и их функциональной активности указывает на ослабление компенсаторного ангиогенеза при этом страдании в связи с образовавшейся дисфункцией эндотелия и недостаточной его репарацией [39]. Замечено, что препараты, оказывающие позитивное действие на течение инсульта, повышают концентрацию ЭПК в периферической крови [67, 68].

Острая церебральная ишемия является индуктором выброса проангиогенных факторов роста. Под влиянием этих веществ ЭКП, мобилизованные из костного мозга в периферическую кровь, направляются к месту деструкции церебрального сосудистого эндотелия, где дифференцируются в зрелые эндотелиоциты [4]. Интенсивность мобилизации ЭПК из костного мозга во многом зависит от уровня выработки проангиогенных индукторов: HIF-1α, эстрогена, эритропоэтина, оксида азота, а также группы сосудистых факторов роста (FGF-2, IGF-1, BDNF, VEGF) [46]. При этом VEGF, продуцируемый этими клетками, выполняет также нейропротективную роль. Применение ингибиторов эндотелиальной NO-синтазы сокращает концентрацию ЭПК и существенно снижает вероятность благоприятного исхода инсульта [55].

Важным направляющим сигналом при мобилизации для ЭПК в зону повреждения является стромальный хемокин SDF-1. Повышая экспрессию CXCR, SDF-1 запускают нейрогенез, способствуя постинсультной миграции нейробластов из субвентрикулярной зоны в область ишемической полутени, где они дифференцируются в зрелые нейроны [69]. Миграция нейробластов прекращается после блокирования CXCR-4. Во время миграции нейробласты активно взаимодействуют с микроциркуляторным руслом мозга, его глиальным окружением и перицитами, которые в этот период особенно активно участвуют в ангиогенезе [45, 70]. Другой хемокин, моноцитарный хемотаксический протеин-1 (MCP-1), повышая приток мононуклеарных клеток, стимулирует артериогенез. MCP-1, из-за его направленной клеточной специфичности, играет патогенетическую роль при различных заболеваниях, связанных с инфильтрацией мононуклеарных клеток, включая инсульт [46]. Предполагается, что именно за счет градиента цитокинов ЭПК перемещаются в зону ишемической полутени, где действуют как паракринные факторы, принимающие непосредственное участие в пролиферации и стабилизации эндотелия.

Тем не менее для улучшения функционального прогноза ишемического инсульта требуются не только стратегии, направленные на скорейшее формирование новых кровеносных сосудов в пораженной области мозга, но и их сочетание с другими методами, что позволяет получить более стабильный и обнадеживающий результат. В частности, существует подход, связанный с попыткой активации пролиферации собственных ЭПК, увеличения их выживаемости и активности в зоне повреждения с помощью небольших доз препаратов, ингибирующих ангиогенез. Имеются пока немногочисленные материалы, свидетельствующие о том, что такая медикаментозная терапия оказывает положительный эффект на стволовые клетки, снижая уровень их апоптоза и увеличивая способность к регенерации ишемизированных тканей [71]. Назначение статинов, особенно в сочетании с системным тромболизисом рекомбинантным тканевым активатором плазминогена, способствует увеличению уровня колониеобразующих ЭПК и более благоприятному исходу заболевания [68]. Однако рассмотреть подробнее возможности такой терапии при ишемическом инсульте пока представляется преждевременным ввиду крайне ограниченного объема имеющейся информации.

Ангиогенез в опухолях головного мозга

В отличие от ишемического инсульта, активизация ангиогенеза при злокачественных новообразованиях имеет неблагоприятные последствия. Быстрый рост и метастатическое распространение опухолей в значительной степени связаны с интенсивным развитием сосудистой сети в малигнизированной ткани, а блокирование ангиогенеза нередко является одним из наиболее эффективных средств ограничения роста солидных опухолей [72]. Известны более 40 ингибиторов ангиогенеза, наиболее изученными из которых являются тромбоспондин, ангиостатин и эндостатин. В частности, эндостатин, подавляя пролиферацию эндотелиальных клеток, тормозит развитие ангиогенеза и рост метастазов, вызывает почти полную регрессию первичных опухолей [73]. Тромбоспондин ингибирует адгезию, пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток [74]. Являясь белком внеклеточного матрикса, он способен регулировать выживаемость различных типов клеток, включая клетки иммунной системы. Тромбоспондин-1, один из наиболее сильных ингибиторов неоваскуляризации *in vitro* и *in vivo*, широко используется в терапии некоторых видов опухолей. В настоящее время

применение различных по химическому составу и механизмам действия ингибиторов ангиогенеза стало стратегическим подходом в лечении некоторых видов опухолей. Вместе с тем антиангиогенная терапия, по-видимому, может стимулировать клетки глиомы к миграции за пределы опухолевого очага, активируя инвазивный рост опухоли [6, 75]. Эта клеточная популяция способна расти и в отсутствие ангиогенеза за счет поглощения и разрушения существующих сосудов.

Рост новых кровеносных сосудов в опухоли опосредован действием молекул, стимулирующих или ингибирующих ангиогенез, многие из которых вовлечены в этот процесс и при действии других факторов. Изменение баланса в сторону регуляторных молекул, активирующих этот процесс, приводит к трансформации клеток в ангиогенный фенотип. Этот феномен, известный как «ангиогенное переключение», лежит в основе развития различного вида опухолей, которые до этого события могут годами находиться в органах и тканях в латентном состоянии [76]. Если трансформация произошла, то 100—300 опухолевых клеток способны запустить ангиогенез [20]. Среди опухолей головного мозга глиомы отличаются особенно высокой степенью злокачественности. Эти часто встречающиеся высоковаскуляризованные опухоли, характеризующиеся интенсивным ростом, приводят к быстрому летальному исходу и потому особенно интересны в качестве мишеней антиангиогенной терапии [6].

Неопластический ангиогенез похож на обычный процесс новообразования сосудов, при котором они формируются из существующих капилляров. Эндотелиальные клетки размножаются и растут в сторону опухолевых клеток. Процесс ангиогенеза в опухоли завершается образованием из массы эндотелиальных клеток сосудистой сети. Стенка сосудов содержит опухолевые клетки, которые способны расти вокруг формирующихся капилляров [72]. ЭПК, циркулирующие в периферической крови, также принимают участие в образовании новых сосудов в малигнизированной ткани.

Ангиогенез в опухоли происходит на фоне измененного экстрацеллюлярного матрикса в условиях нарушенных межклеточных и паренхиматозно-стромальных взаимоотношений. Это приводит к развитию неполноценных сосудов преимущественно капиллярного типа, часто имеющих прерывистую базальную мембрану с нарушенной эндотелиальной выстилкой. Сосудистая система опухоли, состоящая из геморрагических, «протекающих» сосудов, создает благоприятные условия для инвазии опухолевых клеток [8, 76]. Такие сосуды расширены, извилисты, для них характерно отсутствие перицитов и целостной базальной мембраны.

Экстрацеллюлярный матрикс и его изменения являются важными элементами образования новых сосудов. Компоненты экстрацеллюлярного матрикса легко деградируют под влиянием матриксных металлопротеиназ, которые представляют собой семейство гомологичных энзимов, участвующих в реконструкции и морфогенезе тканей. При образовании опухолей наблюдается увеличение активности этих энзимов, поэтому использование ингибиторов матриксных металлопротеиназ может предотвратить или уменьшать распространение и рост злокачественных опухолей [77, 78].

Клетки опухоли — продуценты многочисленных и разнообразных факторов роста сосудов, которые активируют эндотелиоциты, индуцируя тем самым процесс ангиогенеза. Высокий уровень экспрессии мРНК VEGF обнаружен методом гибридизации *in situ* в различных опухолях человека, включая опухоли головного мозга — глиобластомы и капиллярные гемангиобластомы [8]. В ряде исследований представлены данные о наличии корреляции между экспрессией VEGF в глиобластоме и степенью ее злокачественности. Мощным фактором усиления VEGF-сигнализации является гипоксия, наличие которой свойственно солидным опухолям, отличающимся повышенной плотностью клеток. В мультиформной глиобластоме концентрация мРНК VEGF значительно возрастает в участках некроза, где гипоксия наиболее высока. В этих участках увеличивается экспрессия VEGFR-1 и VEGFR-2 на мембранах эндотелиальных клеток, что приводит к связыванию большего количества лиганда и соответственно к усилению VEGF-сигнализации [8]. В то же время внутрибрюшинное введение линейным мышам, несущим клетки глиобластомы, антител против VEGF в значительной степени подавляет процесс образования новых сосудов и рост опухоли. Блокирование VEGFR также ингибирует ангиогенез и замедляет развитие опухоли. Вместе с тем VEGF повышает проницаемость микрососудов, что позволяет жидкости и плазменным компонентам накапливаться в межклеточном пространстве, в результате чего возрастает интерстициальное давление, приводящее к отеку. Это особенно неблагоприятно сказывается на пациентах с церебральными новообразованиями, поскольку высокое внутричерепное давление серьезно осложняет течение основного заболевания.

Помимо VEGF, который обеспечивает экспрессию Dll4 и его рецепторов Notch1, клетки глиобластомы индуцируют продукцию многих других проангиогенных молекул: основного фактора роста фибробластов (bFGF), ангиопоэтина, PDGF, IL-8, фактора роста гепатоцитов (HGF), оказывающих стимулирующее влияние на различные процессы формирования сосудистой сети злокачественных новообразований [8, 20, 79]. Разрушение взаимодействия Dll4—Notch1 вызывает бурный рост кровеносных сосудов. Однако образующиеся сосуды

малофункциональны, незрелы, плохо организованы и потому не обеспечивают в должной степени перфузию ткани, что приводит в конечном итоге к гипоксии и подавлению опухолевого роста [80]. Поэтому сигнальный путь, контролируемый рецептором Notch1, может оказаться полезной мишенью в антиангиогенной терапии злокачественных новообразований.

Регуляция ангиогенеза обеспечивается наличием механизмов, которые побуждают развитие и интеграцию сосудов, ускоряют или подавляют их рост. Решающую роль в этом процессе играют механизмы, связанные с эндотелием. Эндотелиоциты кровеносных сосудов мозга в процессе эволюции приобрели свойства, которые позволяют им регулировать взаимодействие между сосудами, глиальным окружением и нейронами. Капиллярные ростки или почки образуются в ангиогенезе из клеток эндотелия, и это событие предшествует инкорпорации перицитов и астроцитов при формировании гематоэнцефалического барьера. Появление перицитов в дубликатуре базальной мембраны и установление взаимодействия между ними и эндотелиальными клетками приводит к торможению образования новых капилляров и созданию функциональных нейроваскулярных систем.

Под влиянием индукторов ангиогенеза активированные эндотелиальные клетки и их предшественники синтезируют и выделяют ангиогенные молекулы, которые способны инициировать или тормозить ангиогенез. Патофизиологические механизмы ангиогенеза при поражениях мозга сложны и недостаточно изучены, а воздействия на тканевые мишени не всегда вызывают ожидаемый эффект. Поэтому появление новых данных о клеточно-молекулярных механизмах регуляции ангиогенеза в физиологических условиях и при патологии позволит разрабатывать и внедрять все более перспективные направления лечения опухолей.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Arai K, Jin G, Navaratna D, Lo EH. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: neurovascular injury and angiogenic recovery after stroke. *The FEBS Journal*. 2009;276(17):4644-4652. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07176.x
2. Xu QB. Endothelial progenitor cells in angiogenesis. *Sheng Li Xue Bao*. 2005;57(1):1-6
3. Ribatti D, Nico B, Crivellato E. Morphological and molecular aspects of physiological vascular morphogenesis. *Angiogenesis*. 2009;12(2):101-111. https://doi.org/10.1007/s10456-008-9125-1
4. Liman TG, Endres M. New vessels after stroke: postischemic neovascularization and regeneration. *Cerebrovascular Diseases*. 2012;33(5):492-499. https://doi.org/10.1159/000337155
5. Guo H, Zhou H, Lu J, Qu Y, Yu D, Tong Y. Vascular endothelial growth factor: an attractive target in the treatment of hypoxic/ischemic brain injury. *Neural Regeneration Research*. 2016;11(1):174-179. https://doi.org/10.4103/1673-5374.175067
6. Jo J, Schiff D, Purow B. Angiogenic inhibition in high-grade gliomas: past, present and future. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2012;12(6):733-747. https://doi.org/10.1586/ern.12.53
7. Мотавкин П.А., Ломакин А.В., Черток В.М. *Капилляры головного мозга.* Владивосток: ДВНЦ АН СССР; 1983. Motavkin PA, Lomakin AV, Chertok VM. *Brain capillaries*. Vladivostok: DVNTs AN SSSR; 1983. (In Russ.)].
8. Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist*. 2004;9:2-10. https://doi.org/10.1634/theoncologist.9-suppl_1-2
9. Enge M, Bjarnegard M, Gerhardt H, Gustafsson E, Kalen M, Asker N, Hammes HP, Shani M, Fassler R, Betsholtz C. Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *The EMBO Journal*. 2002;21:4307-4316. https://doi.org/10.1093/emboj/cdf418
10. Keerl S, Gehmert S, Gehmert S, Song YH, Alt E. PDGF and bFGF modulate tube formation in adipose tissue-derived stem cells. *Annals of Plastic Surgery*. 2010;64(4):487-490. https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e31819f3a3d
11. Черток В.М. Локальные особенности ультраструктуры внутримозговых артерий плодов человека. *Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 1988;88:(10):55-58. [Chertok VM. Local ultrastructural characteristics of the intracerebral arteries of human fetuses. *Zhurnal nevropatologii i psikhiatrii im SS Korsakova*. 1988;88:(10):55-58. (In Russ.)].
12. Черток В.М., Черток А.Г. Регуляторный потенциал капилляров мозга. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2016;2:72-81. [Chertok VM, Chertok AG. Regulatory capacity of the brain capillaries. *Pacific Medical Journal*. 2016;2:72-81. (In Russ.)]. https://doi.org/10.17238/1609-1175.2016.2.72
13. Ribatti D, Nico B, Crivellato E. The role of pericytes in angiogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*. 2011;55(3):261-268. https://doi.org/10.1387/ijdb.103167dr
14. Ломакин А.В., Черток В.М. Развитие капилляров мозга человека. *Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 1983;82(7): 1004-1007. [Lomakin AV, Chertok VM. Development of capillaries in the human brain. *Zhurnal nevropatologii i psikhiatrii im SS. Korsakova.* 1983; 82(7):1004-1007. (In Russ.)].
15. Engelhardt B, Liebner S. Novel insights into the development and maintenance of the blood-brain barrier. *Cell and Tissue Research*. 2014;355(3):687-699. https://doi.org/10.1007/s00441-014-1811-2
16. Черток В.М. Возрастные изменения капилляров головного мозга человека (гистохимическое исследование). *Морфология.* 1985;2(88):28-35. [Chertok VM. Age and changes in human brain capillaries (histochemical study). *Morfologiya*. 1985;2(88):28-35. (In Russ.)].
17. Черток В.М., Мирошниченко Н.В. Гистохимическая характеристика сосудисто-капиллярного русла головного мозга при старении и атеросклерозе. *Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 1984;84:7:997-1000. [Chertok VM, Miroshnichenko NV. Histochemical characteristics of the vascular-capillary bed of the brain during aging and in arteriosclerosis. *Zhurnal nevropatologii i psikhiatrii im SS Korsakova*. 1984;84:7:997-1000. (In Russ.)].
18. Herbert SP, Stainier DY. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2011;12(9):551-564. https://doi.org/10.1038/nrm3176
19. Sen S, McDonald SP, Coates PT, Bonder CS. Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. *Clinical Science* (Lond). 2011;120:263-283. https://doi.org/10.1042/cs20100429
20. Чехонин В.П., Шеин С.А., Корчагина А.А., Гурина О.И. Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012;67(2):23-34. [Chekhonin VP, Shein SA, Korchagina AA, Gurina OI. VEGF in neoplastic angiogenesis. *Annals of the Russian academy of medical sciences.* 2012;67(2):23-34. (In Russ.)]. https://doi.org/10.15690/vramn.v67i2.119
21. Gaengel K, Genovй G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2009;29(5):630-638. https://doi.org/ 10.1161/ATVBAHA.107.161521

22. Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*. 2009;21(2):154-165. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.12.012

23. Patel-Hett S, D'Amore PA. Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis *The International Journal of Developmental Biology*. 2011;55(4-5):353-363. https://doi.org/10.1387/ijdb.103213sp

24. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011;146(6):873-887. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.039

25. Kubis N, Levy BI. Vasculogenesis and angiogenesis: molecular and cellular controls. Part I: growth factors. *Morphologie*. 2003;87(276):23-30.

26. Bikfalvi A. Platelet factor 4: an inhibitor of angiogenesis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2004;30(3):379-385. https://doi.org/10.1055/s-2004-831051

27. Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell and Tissue Research*. 2003;314(1):15-23.

28. Stapor PC, Sweat RS, Dashti DC, Betancourt AM, Murfee WL. Pericyte dynamics during angiogenesis: new insights from new identities. *Journal of Vascular Research*. 2014;51(3):163-174. https://doi.org/10.1159/000362276

29. Siegenthaler JA, Choe Y, Patterson KP, Hsieh I, Li D, Jaminet SC, Daneman R, Kume T, Huang EJ, Pleasure SJ. Foxc1 is required by pericytes during fetal brain angiogenesis. *Biology Open*. 2013;2(7):647-659. https://doi.org/10.1242/bio.20135009

30. Alexander MR, Owens GK. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annual Review of Physiology*. 2012;74:13-40. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142315

31. Tomlinson A, Van Vlijmen A, Loesch A, Burnstock G. An immunohistochemical study of endothelial cell heterogeneity in the rat: observations in «en face» Hautchen preparations. *Cell and Tissue Research*. 1991;263(1):173-181. https://doi.org/10.1007/bf00318413

32. Brzozowa M, Mielacczyk L, Michalski M, Malinowski L, Kowalczyk-Ziomek G, Helewski K, Harabin-Siowicska M, Wojnicz R. Role of Notch signaling pathway in gastric cancer pathogenesis. *Contemporary Oncology* (Pozn). 2013;17(1):1-5. https://doi.org/10.5114/wo.2013.33765

33. Moreno-Miralles I, Schisler JC, Patterson C. New insights into bone morphogenetic protein signaling: focus on angiogenesis. *Current Opinion in Hematology*. 2009;16(3):195-201. https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32832a07d6

34. Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, Coetzee S, Boland P, Gale NW, Lin HC, Yancopoulos GD, Thurston G. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature*. 2006;444:1032-1037. https://doi.org/10.1038/nature05355

35. Medina RJ, O'Neill CL, Sweeney M, Guduric-Fuchs J, Gardiner TA, Simpson DA, Stitt AW. Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities. *BMC Medical Genomics*. 2010;3:18. https://doi.org/10.1186/1755-8794-3-18

36. Kawamoto A, Losordo DW. Endothelial progenitor cells for cardiovascular regeneration. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2008;18(1):33-37. https://doi.org/10.1016/j.tcm.2007.11.004

37. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-967. https://doi.org/10.1126/science.275.5302.964

38. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 1998;92:362-367.

39. Белова Ю.А., Чуксина Ю.Ю., Шевелев С.В., Яздовский В.В., Котов С.В. Уровень эндотелиальных прогениторных клеток у больных с ишемическим инсультом и эффективность реабилитации. *Альманах клинической медицины*. 2015;(39):45-50. [Belova YuA, Chuksina YuYu, Shevelev SV, Yazdovskiy VV, Kotov SV. Levels of endothelial progenitor cells in patients with ischemic stroke and efficacy of rehabilitation. *Almanac of Clinical Medicine*. 2015;(39):45-50. (In Russ.)]. https://doi.org/10.18786/2072-0505-2015-39-45-50

40. Asahara T. Endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Yakugaku Zasshi*. 2007;5(127):841-845. https://doi.org/10.1248/yakushi.127.841

41. Navarro-Sobrino M, Rosell A, Hernandez-Guillamon M, Penalba A, Riby M, Alvarez-Sabнn J, Montaner J. Mobilization, endothelial differentiation and functional capacity of endothelial progenitor cells after ischemic stroke. *Microvascular Research*. 2010;80(3):317-323. https://doi.org/10.1016/j.mvr.2010.05.008

42. Arai K, Lok J, Guo S, Hayakawa K, Xing C, Lo EH. Cellular mechanisms of neurovascular damage and repair after stroke. *Journal of Child Neurology*. 2011;26(9):1193-1198. https://doi.org/10.1177/0883073811408610

43. Timmermans F, Van Hauwermeiren F, De Smedt M, Raedt R, Plasschaert F, De Buyzere ML, Gillebert TC, Plum J, Vandekerckhove B. Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007;27(7):1572-1579. https://doi.org/10.1161/atvbaha.107.144972

44. Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, Sasaki K, Kaiser R, Makhfi N, Urbich C, Peters T, Scharffetter-Kochanek K, Zeiher AM, Chavakis T, Dimmeler S. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2005;201(1):63-72. https://doi.org/10.1084/jem.20041402

45. Гусев Е.И., Скворцова В.И. *Ишемия головного мозга*. М.: Медицина; 2001. [Gusev EI, Skvortsova VI. *Ishemiya golovnogo mozga*. M.: Meditsina; 2001. (In Russ.)].

46. Ruan L, Wang B., ZhuGe Q., Jin K. Coupling of neurogenesis and angiogenesis after ischemic stroke. *Brain Research*. 2015;1623:166-173. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.02.042

47. Zhang JH, Yu H, Zhou N, Zhang J, Wu Y, Zhang Y, Bai Y, Jia J, Zhang Q, Tian S, Wu J, Hu Y. Early exercise improves cerebral blood flow through increased angiogenesis in experimental stroke rat model. *Journal of Neuro-Engineering and Rehabilitationl*. 2013;1(10):43. https://doi.org/10.1186/1743-0003-10-43

48. Donnan GA, Baron J-C, Davis SM, Sharp FR, eds. *Ischemic Penumbra*. CRC Press; 2007.

49. Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S, Wang JM. Some remarks on the growth-rate and angiogenesis of microvessels in ischemic stroke. Morphometric and immunocytochemical studies. *Patologia polska*. 1993;44(4):203-209.

50. Aslam M, Schluter KD, Rohrbach S, Rafiq A, Nazli S, Piper HM, Noll T, Schulz R, Gьndьz D. Hypoxia-reoxygenation-induced endothelial barrier failure: role of RhoA, Rac1 and myosin light chain kinase. *The Journal of Physiology*. 2013;591(2):461-473. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.237834

51. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Zhang R, Davies K, Powers C, van Bruggen N, Chopp. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *Journal of Clinical Investigation*. 2000;7(106):829-838. https://doi.org/10.1172/jci9369

52. Hirota K, Semenza GL. Rac1 activity is required for the activation of hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(24):21166-21172. https://doi.org/10.1074/jbc.m100677200

53. Черток В.М., Коцюба А.Е., Старцева М.С., Коцюба Е.П. Иммунолокализация газотрансмиттеров в межъядерных интернейронах продолговатого мозга у крыс. *Нейрохимия*. 2016;2(33):95-102. [Chertok VM, Kotsyuba AE, Startseva MS, Kotsyuba EP. Immunolocalization of gas-transmitters in internuclear interneurons of a medulla at rats. *Neirokhimiya*. 2016;2(33):95-102. (In Russ.)]. https://doi.org/10.7868/S1027813316010040

54. Chen J, Zacharek A, Zhang C, Jiang H, Li Y, Roberts C, Lu M, Kapke A, Chopp M. Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice. *Journal of Neuroscience*. 2005;25(9):2366-2375. https://doi.org/10.1523/jneurosci.5071-04.2005

55. Zhang RL, Zhang ZG, Chopp M. Targeting nitric oxide in the subacute restorative treatment of ischemic stroke. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2013;22(7):843-851. https://doi.org/10.1517/13543784.2013

56. Реутов В.П., Черток В.М. Новые представления о роли вегетативной нервной системы и систем генерации оксида азота в сосудах мозга. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2016;2:10-20. [Reutov VP, Chertok VM. The new understanding of the autonomic nervous system role and the nitric oxide generating system in the brain vessels. *Pacific Medical Journal*. 2016;2:10-20. (In Russ.)]. https://doi.org/10.17238/pmj1609-1175.2016.2.10-20

57. Реутов В.П., Черток В.М., Швалев В.Н., Розинова В.Н., Лычкова А.Э., Сорокина Е.Г., Бирулина Ю.Г., Смаглий Л.В., Носарев А.В., Петрова И.В., Ковалев И.В., Гусакова С.В. Симпатический отдел вегетативной нервной системы сосудов крови мозга и медиаторы норадреналин и адреналин защищают эндотелий и клетки интимы от повреждающего воздействия диоксида азота (NO_2), образующегося в местах бифуркации сосудов при нарушении циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала. *Сборник научных работ XVIII Международной научной конференции Евразийского научного объединения*. 2016;6(18):36-42. [Reutov VP, Chertok VM, Shvalev VN, Rozinova VN, Lychkova AE, Sorokina EG, Birulina YuG, Smaglii LV, Nosarev AV, Petrova IV, Kovalev IV, Gusakova SV. The sympathetic division of the autonomic nervous system of brain vessels and mediators noradrenaline and adrenaline protect endothelium and intimal cells from the damaging impact of dioxide of the nitrogen (NO_2) which is formed in places of bifurcation of vessels in case of violation of cycles of nitrogen oxide and superoxidic radical

anion. *Scientific articles collection of the 18th International Scientific Conference of Eurasian Scientific Association*. 2016;6(18):36-42. (In Russ.)].

58. Kotsyuba AE, Chertok VM, Kotsyuba EP. Nitroxidergic nerve fibers of intracerebral vessels. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2010;4(40):451-455. https://doi.org/10.1007/s11055-010-9278-4

59. Hamel E. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *Journal of Applied Physiology.* 2006;3(100):1059-1064. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00954.2005.

60. Chertok VM, Kotsyuba AE. Comparative study of catecholaminergic and nitroxidergic neurons in the vasomotor nuclei of the caudal part of the brainstem in rats. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2016;2(46):229-234. https://doi.org/10.1007/s11055-015-0215-4

61. Коцюба А.Е., Старцева М.С., Черток В.М. Топохимия межъядерных интернейронов в стволе мозга человека при артериальной гипертензии. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2015;115(11):15-20. [Kotsyuba AE, Startseva MS, Chertok VM. Topochemistry of internuclear interneurons in the human brain stem in arterial hypertension. *Zhurnal nevrologii i psikhiatrii im SS Korsakova*. 2015;115(11):15-20. (In Russ.)]. https://doi.org/10.17116/jnevro201511511115-20

62. Черток В.М., Коцюба А.Е., Старцева М.С. Межъядерные интернейроны в стволе мозга человека. *Вестник РАМН*. 2015;70(5):608-613. [Chertok VM, Kotsyuba AE, Startseva MS. Interneurons Brainstem of the Human. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk-Annals of the Russian Academy of Medical Science*. 2015;70(5):608-613. (In Russ.)]. https://doi.org/10.15690/vramn.v70.i5.1450

63. Черток В.М. Тучные клетки наружной оболочки артерий основания головного мозга. *Архив анатомии, патологии и эмбриологии*. 1980;11(79):72-79. [Chertok VM. Mast cells of the outer coat of the arteries of the basis cerebri. *Arkhiv anatomii, gistologii i ümbriologii*. 1980;11(79):72-79. (In Russ.)].

64. Мотавкин П.А., Черток В.М., Шульга С.Д. Влияние ацетилхолина на тучные клетки твердой мозговой оболочки. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1979;87(5):489-491. [Motavkin PA, Chertok VM, Shul'ga SD. Effect of acetylcholine on the mast cells of the dura mater. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny.* 1979;87(5):489-491. (In Russ.)].

65. Blair RJ, Meng H, Marchese MJ, Ren S, Schwartz LB, Tonnesen MG, Gruber DL. Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor. *The Journal of Clinical Investigation*. 1997;11(99):2691-2700. https://doi.org/10.1172/jci119458

66. Bogoslovsky T, Chaudhry A, Latour L, Maric D, Luby M, Spatz M, Frank J, Warach S. Endothelial progenitor cells correlate with lesion volume and growth in acute stroke. *Neurology*. 2010;75(23):2059-2062. https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318200d741

67. Overgaard K. The effects of citicoline on acute ischemic stroke: a review. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. 2014;23(7):1764-1769. https://doi.org/10.10.16/j.jstrokecerebrovasdis.2014.01.0

68. Sobrino T, Rodriguez-Gonzalez R, Blanco M, Brea D, Perez-Mato M, Rodriguez-Yanez M, Leira R, Castillo J. CDP-choline treatment increases circulating endothelial progenitor cells in acute ischemic stroke. *Neurological Researc*h. 2011;33(6):572-577. https://doi.org/10.1179/016164110x12807570510176

69. Borlongan CV, Glover LE, Tajiri N, Kaneko Y, Freeman TB. The great migration of bone marrow-derived stem cells toward the ischemic brain: therapeutic implications for stroke and other neurological disorders. *Progress in Neurobiology*. 2011;95(2):213-228. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.08.005

70. Chen Y, Li Q, Tang J, Feng H, Zhang JH. The evolving roles of pericyte in early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Brain Research*. 2015;1623:110-122. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.05.004

71. Домбровский А.Л., Сергиенко И.В., Рвачева А.В., Аншелес А.А., Семенова А.Е., Кухарчук В.В. Влияние терапии аторвастатином в различных дозах на эндотелиальные прогениторные клетки и факторы ангиогенеза у больных ишемической болезнью сердца. *Атеросклероз и дислипидемии*. 2015;2(19):56-68. [Dombrovskiy AL, Sergienko IV, Rvacheva AV, Ansheles AA, Semenova AE, Kukharchuk VV. Effect of different doses of atorvastatin therapy on endothelial progenitor cells and angiogenic factors in patients with ischemic heart disease. *Journal of atherosclerosis and dyslipidemia*. 2015;2(19):56-68. (In Russ.)].

72. Folkman J. Angiogenesis. *Annual Review of Medicine*. 2006;1(57):1-18. https://doi.org/10.1146/annurev.med.57.121304.131306

73. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y. Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*. 1997;2(88):277-285. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81848-6

74. Mirochnik Y, Kwiatek A, and Volpert OV. Thrombospondin and apoptosis: molecular mechanisms and use for design of complementation treatments. *Current Drug Targets*. 2008;9(10):851-862. https://doi.org/10.2174/138945008785909347

75. Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vicals F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D, Casanovas O. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell*. 2009;15(3):220-231. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.027

76. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005;438(7070):967-974. https://doi.org/10.1038/nature04483

77. Lu X, Duan L, Xie H, Lu X, Lu D, Lu D, Jiang N, Chen Y. Evaluation of MMP-9 and MMP-2 and their suppressor TIMP-1 and TIMP-2 in adenocarcinoma of esophagogastric junction. *OncoTargets and Therapy*. 2016;9:4343-4349. https://doi.org/10.2147/OTT.S99580

78. Tjomsland V, Pomianowska E, Aasrum M, Sandnes D, Verbeke CS, Gladhaug IP. Profile of MMP and TIMP Expression in Human Pancreatic Stellate Cells: Regulation by IL-1б and TGFв and Implications for Migration of Pancreatic Cancer Cells. *Neoplasia*. 2016;18(7):447-456. https://doi.org/10.1016/j.neo.2016.06.003

79. Liu Z, Fan F, Wang A, Zheng S, Lu Y. Dll4-Notch signaling in regulation of tumor angiogenesis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2014;140(4):525-536. https://doi.org/10.1007/s00432-013-1534-x

80. Garcia A, Kandel JJ. Notch: a key regulator of tumor angiogenesis and metastasis. *Journal of Histology and Histopathology*. 2012;27(2):151-156.