

УДК 57.085.23

ВЛИЯНИЕ РАСТВОРИМОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА Dll4-Fc НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ *IN VITRO* И ВАСКУЛЯРИЗАЦИЮ *IN VIVO*

© 2019 г. Ю. И. Хорольская¹*, О. И. Александрова¹, И. А. Самусенко², Н. А. Михайлова¹,
И. Б. Лобов¹, Н. М. Юдинцева¹, М. И. Блинова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

²Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России,
Санкт-Петербург, 194044, Россия

*E-mail: juliya_khorolskaya@mail.ru

Поступила в редакцию 02.10.2018 г.

После доработки 10.12.2018 г.

Принята к публикации 15.10.2018 г.

В ходе процессов ранозаживления обязательным условием является восстановление системы микроциркуляторного русла. Усиление ангиогенеза в поврежденной ткани может позитивно сказаться на скорости и качестве ее восстановления. В работе проанализировано влияние растворимого рекомбинантного белка Dll4-Fc на функциональную активность эндотелиальных клеток человека линий HUVEC, HUVEC-56 и ECV-304 в условиях дву- (2D) и трехмерного (3D) культивирования *in vitro* и формирование капиллярной сети в процессе раневого заживления у крыс в экспериментах *in vivo* с целью возможного использования белка Dll4-Fc при разработке биомедицинских клеточных продуктов (БМКП), направленных на стимуляцию роста кровеносных сосудов в процессе репарации поврежденных органов и тканей. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в условиях 2D-культивирования Dll4-Fc не оказывает влияния на пролиферативную и миграционную активность эндотелиоцитов. Однако в условиях 3D-культивирования клеток ECV-304 на поверхности коллагенового геля было выявлено позитивное влияние Dll4-Fc на морфологию клеточного пласта эндотелиоцитов и процесс формирования ими капилляроподобных структур. Впервые было показано позитивное влияние применения “Эквивалента дермального ЭД” в композиции с эндотелиальными клетками пупочной вены человека HUVEC и Dll4-Fc на процессы образования сосудов в области заживления.

Ключевые слова: Notch-сигналинг, Dll4-Fc, ангиогенез, эндотелиоциты, дермальные фибробласты, дермальный эквивалент, биомедицинский клеточный продукт

DOI: 10.1134/S0041377119030064

В настоящее время разработка и применение биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) является особенно актуальным вопросом в области регенеративной медицины. Ведущие биотехнологические компании и научные организации всего мира уже давно ведут разработки БМКП с целью восстановления поврежденных участков различных органов и тканей. На мировом рынке клеточных технологий уже есть сертифицированные клеточные продукты, а множество различных вариантов находится в стадии разработки и тестирования. Наиболее востребованными являются разработки, направленные на восстановление сердечно-сосудистой, нервной,

эндокринной систем, покровных тканей и элементов опорно-двигательной системы (Зорин и др., 2009, 2010). БМКП “Эквивалент дермальный ЭД” (далее ЭД), разработанный в Институте цитологии РАН, представляет собой комплекс из коллагенового геля (коллаген I типа) и заключенных в него дермальных фибробластов человека. Приготовленный в условиях *in vitro* ЭД обладает всеми необходимыми компонентами для запуска процесса восстановления поврежденного кожного покрова. Было показано, что ЭД обеспечивает восстановление всех типов кожных повреждений (Блинова и др., 2015).

В ходе восстановления ткани обязательным условием является восстановление системы кровоснабжения, что сопровождается процессами репаративного ангиогенеза в поврежденной области (Schrementi et al., 2015). Доставка кислорода и питательных веществ из новообразованных кровеносных сосудов

Принятые сокращения: БМКП – биомедицинский клеточный продукт, ЭД – БМКП “Эквивалент дермальный ЭД”, Dll4 – белок семейства Delta 4, HUVEC – эндотелиальные клетки пупочной вены человека, VEGF – фактор роста эндотелия сосудов.

является необходимым условием восстановления ткани, и нарушение процесса образования сосудов часто приводит к снижению скорости заживления ран (Johnson, Wilgus, 2014). В области раневой хирургии и сердечно-сосудистых заболеваний применяются различные терапевтические средства для коррекции ангиогенеза и стимуляции роста новых кровеносных сосудов (терапевтический ангиогенез) (Jojovic et al., 1998; Мжаванадзе и др., 2012). Концепция терапевтического ангиогенеза в последние десятилетия прошла период развития от гипотез, предложенных вскоре после первых работ Фолькмана (Folkman, 1971; Shing et al., 1984) до масштабных клинических испытаний. Изучение различных подходов, способствующих быстрой и эффективной васкуляризации трансплантатов различных тканей, разработка клеточных продуктов или конкретных соединений, направленных на стимуляцию роста кровеносных сосудов в процессе репарации ткани является актуальной задачей в настоящее время (Groeber et al., 2016).

Существуют три основных подхода к стимулированию васкуляризации в процессе заживления ран с использованием БМКП: 1) включение в состав клеточных продуктов различных растворимых проангиогенных факторов; 2) генетическая модификация клеток, входящих в состав продукта; 3) внесение эндотелиальных клеток на или в матрицы и каркасы тканеинженерных конструкций (Montaño et al., 2010). Одним из факторов, контролирующих процессы ангиогенеза, является продуцирующийся исключительно в эндотелиальных клетках белок Dll4 (белок семейства Delta 4). Известно, что белок Dll4, являющийся лигандом для рецепторов Notch 1 и Notch 4, необходим для регуляции образования сосудов в ответ на VEGF, а также для созревания новообразующихся сосудов, включая регуляцию формирования просвета (Rizzo et al., 2014; Lobov, Mikhailova, 2018). Сигналинг Dll4/Notch является негативным регулятором VEGF-индуцированного ангиогенеза, нарушение этого сигналинга приводит к усиленному образованию кровеносных сосудов. Предполагается, что фармакологическое ингибирование Dll4 может применяться при терапии различных заболеваний, связанных с формированием сосудистой сети (Lobov et al., 2007; Trindade et al., 2012). Dll4-Fc — растворимый рекомбинантный белок, состоящий из внеклеточного домена Dll4 человека, соединенного с Fc-фрагментом IgG1 человека. Dll4-Fc связывается с Notch-рецепторами, предотвращая их взаимодействие с эндогенными лигандами Notch, и ингибирует передачу сигналов Notch *in vitro* и *in vivo* (Noguera-Troise et al., 2006; Lobov et al., 2007, 2011; Trindade et al., 2012). Благодаря своим свойствам данный лиганд может рассматриваться как потенциальный агент, участвующий в ингибировании Notch-сигналинга и способствующий усилению ангиогенеза при различных патологических состояниях и терапевтических подходах, например, для ускорения формирования сосудистой сети при восстановлении кожных повре-

ждений, в частности, с использованием различных БМКП, например, ЭД. Можно ожидать, что использование растворимого рекомбинантного белка Dll4-Fc в составе БМКП будет способствовать формированию капиллярной сети в процессе раневого заживления, что предположительно должно будет оптимизировать условия функционирования регенерирующей ткани под влиянием клеточного продукта.

Для оценки ангиогенных свойств компонентов БМКП используют большое число тест-систем *in vitro* и *in vivo*. В настоящее время существует немало хорошо изученных стандартизованных методов оценки влияния физиологически активных факторов на клетки с использованием тест-систем *in vitro*. Однако изучение сложных физиологических процессов, например, ангиогенеза в условиях *in vitro* все еще является серьезным испытанием для исследователей (Montaño et al., 2010). Ангиогенез — сложный многофакторный процесс и для его нормального протекания необходимо определенное пространственное расположение эндотелиальных клеток относительно друг друга и матрикса. Таким образом, особый интерес в данной области исследований вызывают трехмерные (3D) клеточные тест-системы *in vitro* (Tremblay et al., 2005; Chwalek et al., 2014; Groeber et al., 2016).

В настоящей работе проанализировано влияние Dll4-Fc на функциональную активность эндотелиоцитов в условиях *in vitro*, возможность и эффективность применения ЭД в комплексе с эндотелиальными клетками пупочной вены человека (HUVES) и растворимым рекомбинантным белком Dll4-Fc.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные культуры. Использовали 3 линии эндотелиальных клеток человека: HUVES (эндотелиальные клетки пупочной вены человека), выделенные авторами из пупочной вены человека; HUVES-56, полученные из коллекции Design active proteins (Cleveland experimental laboratories Inc., США); ECV-304, полученные из Коллекции клеточных культур НИИ гриппа МЗ РФ (Санкт-Петербург). Кроме того, использовали дермальные фибробласты (ДФ) человека. ДФ были выделены из фрагментов кожи лица взрослых доноров, полученной после корректирующих операций. Клетки линий HUVES и HUVES-56 культивировали в питательной среде Endothelial cell basal medium 2 kit (PromoCell, США) в культуральных сосудах, обработанных желатиной (0.5%); клетки линии ECV-304 — в питательной среде RPMI (Gibco, США); ДФ — в питательной среде DMEM (Gibco, США). Все ростовые питательные среды содержали 10% фетальной сыворотки коров (FBS; HyClone, США). Клетки культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Выбор концентрации белка Dll4-Fc производства Abscam (США) для экспериментов базировался на основе данных, полученных при проведении преды-

дущих собственных исследований, а также на основе данных из литературы (Scehnet et al., 2007). Белок добавляли в питательную среду для культивирования клеток в конечной концентрации 100 и 200 нг/мл в экспериментах *in vitro* и 100 нг/мл в ЭД для экспериментов *in vivo*.

Животные. В работе использовали шесть самцов крыс линии Wistar. Все процедуры были проведены согласно правилам обращения с лабораторными животными, подтвержденными сертификатом OLAWNIN (Идентификационный номер F18-00380 Институт цитологии РАН).

Оценка пролиферативной и миграционной активности клеток с использованием системы xCELLigence RTCA-DP. Система клеточного анализа xCELLigence (Roche Applied Science and ACEA Biosciences, Швейцария) основана на микроэлектронных биосенсорах, которые позволяют динамически в реальном времени анализировать клеточный ответ без использования дополнительных маркеров или меток. В технологии xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) микроэлектронные клеточные сенсоры интегрированы в дно лунок специальных культуральных планшетов: E-Plate (для исследования динамики роста клеточных культур, т.е. для определения скорости пролиферации) и CIM-plate (для исследования динамики миграции клеток).

Для анализа действия белка Dll4-Fc на пролиферативную и миграционную активность эндотелиоцитов при помощи системы xCELLigence клетки линий ECV-304 и HUVEC-56 высевали в лунки планшетов E-Plate и CIM-Plate (Roche, Швейцария) по 10^4 клеток на лунку в соответствующей питательной среде и добавляли белок Dll4-Fc до конечной концентрации 100 или 200 нг/мл. Контролем служили клетки, культивируемые в питательной среде в стандартных условиях без добавления белка. Планшеты помещали в клеточный анализатор RTCA-DP (ACEA Biosciences, США) и анализировали в режиме реального времени динамику пролиферации клеток в течение 70 ч и динамику миграции клеток в течение 24 ч. Анализ результатов проводили с помощью программного обеспечения RTCA Software 1.2.1 (ACEA Biosciences, США). Изменение сопротивления на микроэлектродных плат выражали как клеточный индекс, отражающий изменение числа клеток в лунке по мере культивирования. Данные представляли в виде графиков зависимости среднего значения клеточного индекса (и его стандартного отклонения) от срока культивирования.

Приготовление трехмерных клеточных композиций. В качестве экспериментальной модели для изучения влияния рекомбинантного белка Dll4-Fc на формирование капиллярной сети в процессе раннего заживления *in vivo* и оценки влияния белка Dll4-Fc на эндотелиоциты в условиях 3D-культивирования *in vitro* служил ЭД. Для его приготовления использовали препарат коллагена I типа, а именно,

Таблица 1. Компоненты клеточных композиций в эксперименте *in vivo* на ранах лабораторных животных

Экспериментальные варианты	Компоненты клеточных композиций		
	ЭД	HUVEC	Dll4-Fc
Контроль	—	—	—
ЭД + эндотелиоциты	+	+	-
ЭД + Dll4-Fc	+	-	+
ЭД + HUVEC + Dll4-Fc	+	+	+

“Коллаген I типа желирующий”, разработанный в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург), получаемый методом кислотной экстракции из сухожилий хвостов крыс (Chandrakasan, 1976). В эксперименте *in vivo* на ранах лабораторных животных (крысы) использовали различные комбинации ЭД с эндотелиоцитами и Dll4-Fc (табл. 1), а именно: 1) ЭД с эндотелиальными клетками линии HUVEC, высеванными на поверхность коллагенового геля; 2) ЭД с добавлением в состав коллагенового геля рекомбинантного белка Dll4-Fc; 3) ЭД с клетками линии HUVEC на поверхности геля и белком Dll4-Fc в составе коллагенового геля.

Для приготовления ЭД и его модификаций смешивали “Коллаген I типа желирующий”, концентрированную (10-кратную) среду 199 (Gibco, США) и стерильный 0.34 Н раствор NaOH (Sigma, США). В полученную смесь добавляли суспензию ДФ человека (в концентрации 10^5 кл./мл). Конечная концентрации коллагена составляла 2 мг/мл. Раствор инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 30 мин до полной полимеризации коллагена. В случае модификаций с участием HUVEC эти клетки высевали на поверхность полимеризованного коллагенового геля из расчета 10^5 клеток на 2 см². Рекомбинантный белок Dll4-Fc добавляли в состав коллагенового геля в процессе его приготовления в конечной концентрации 100 нг/мл. В эксперименте *in vitro* использовали только коллагеновый гель, не содержащий в своем составе ДФ.

Оценка влияния Dll4-Fc на морфологию пласта эндотелиоцитов в условиях 3D-культивирования *in vitro*. Для этого в условиях 3D формировали бесклеточный коллагеновый гель, на поверхность которого высевали клетки линии ECV-304 из расчета 10^5 клеток на 2 см². Dll4-Fc в конечной концентрации 100 нг/мл добавляли в питательную среду в момент посева клеток на поверхность геля. В контрольном варианте клетки культивировали на поверхности коллагенового геля в отсутствие Dll4-Fc. 3D-композицию инкубиро-

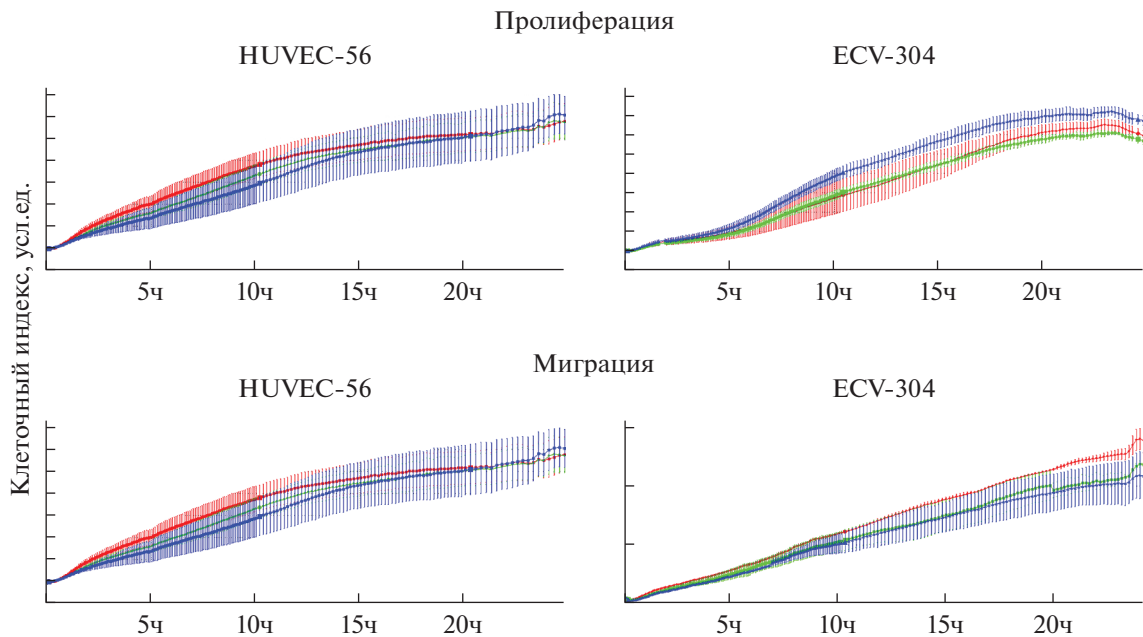


Рис. 1. Влияние Dll4-Fc на пролиферацию и миграцию клеток HUVEC-56 и ECV-304.

Представлены кривые пролиферации и миграции (среднеарифметические значения и стандартные отклонения). Красная кривая — контроль, зеленая — Dll4-Fc 100 нг/мл, синяя — 200 нг/мл Dll4-Fc). Все кривые не отличаются значимо друг от друга. Это позволяет сделать вывод о том, что Dll4-Fc в использованных концентрациях не оказывает влияния на пролиферативную и миграционную активность эндотелиальных клеточных линий.

вали в CO_2 -инкубаторе при 37°C в течение 12 сут. О влиянии белка на эндотелиальные клетки судили по морфологии клеточного пласта.

Прижизненное наблюдение за клетками в процессе их культивирования осуществляли при помощи инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Япония), используя объектив с увеличением $10\times$ или $20\times$.

Оценка влияния Dll4-Fc на формирование капиллярной сети в процессе раневого заживления *in vivo*. Материал готовили за 1 сут до его трансплантации крысам. Исследование проводили согласно сформированным экспериментальным группам (табл. 1). На спине каждой крысы было сформировано по 4 экспериментальные раны диаметром 1 см каждая, при этом в каждую рану вносили компоненты в различных комбинациях, указанных в таблице. Раны закрывали стерильными повязками. На 5-е и 10-е сут после трансплантации проводили забор биоптатов регенерирующей ткани для гистологического анализа.

Морфологическое исследование биоптатов заживающей раны. Гистологическое исследование проводили после окрашивания срезов гематоксилином и эозином при помощи светооптического микроскопа Leica DM LS (Германия). Микрофотографии получали с использованием цифровой фотокамеры Leica DC320. О влиянии Dll4-Fc на формирование капиллярной сети в процессе раневого заживления *in vivo* судили по числу капилляров на площади 1 мм^2 . Данные представляли в виде гистограмм среднего значения

показателей и стандартного отклонения. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием программы Microsoft Office Excel 2013. Оценку различий между выборками проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Критический уровень значимости был принят при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пролиферативная и миграционная активность клеток в присутствии Dll4-Fc. Непрерывный мониторинг воздействия Dll4-Fc на эндотелиоциты проводили, используя систему клеточного анализа xCELLigence (ACEA Biosciences, США), позволяющего в режиме реального времени наблюдать за динамикой роста клеточных культур (пролиферацией) и их миграцией. Результаты непрерывного мониторинга действия Dll4-Fc в отношении клеток линий HUVEC-56 и ECV-304, полученные при помощи клеточного анализатора xCELLigence, приведены на рис. 1.

Как можно видеть на представленных графиках, в присутствии рекомбинантного белка Dll4-Fc в концентрациях 100 или 200 нг/мл пролиферативная и миграционная активность клеточных культур HUVEC-56 и ECV-304 сопоставима с контролем. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что рекомбинантный белок Dll4-Fc в исследуемых концентрациях не оказывает ни позитивного, ни негативного влияния на пролиферативную и миграци-

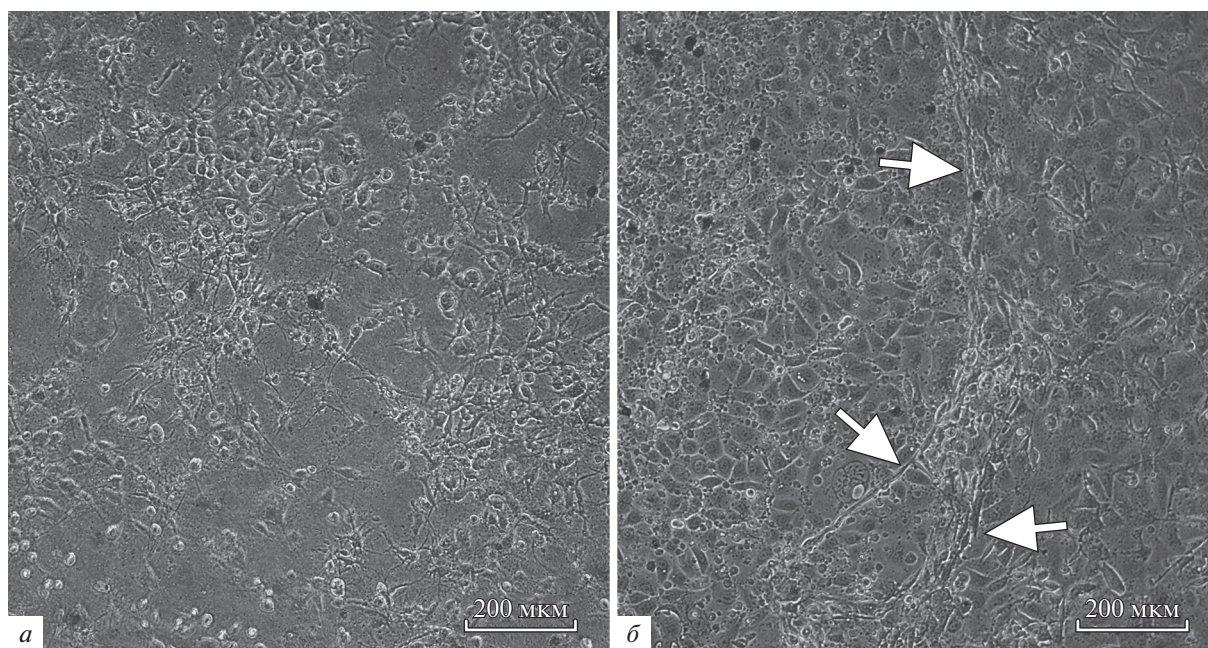


Рис. 2. Клетки линии ECV-304 через 12 сут культивирования на поверхности коллагенового геля в контроле (а) и в присутствии 100 нг/мл Dll4-Fc в питательной среде (б).

а — клетки распластаны, но монослой не сформировали; б — клетки сформировали монослой, кроме того, на поверхности геля видно формирование клетками капилляроподобных структур (стрелки). Фазово-контрастная микроскопия. Масштабная линейка: 200 мкм.

онную активность использованных клеточных линий в условиях 2D-культивирования.

Влияние Dll4-Fc на морфологию пласта эндотелиоцитов в условиях 3D-культивирования *in vitro*. Результаты прижизненного наблюдения за клетками линии ECV-304 на 12-е сут культивирования на поверхности коллагеновых гелей в присутствии Dll4-Fc в составе питательной среды представлены на рис. 2. Как можно видеть на представленных фотографиях, в контрольном варианте клетки распластаны на поверхности коллагенового геля, но монослой не сформировали; часть клеток мигрирует внутрь геля. В варианте с присутствием Dll4-Fc в питательной среде в концентрации 100 нг/мл клетки линии ECV-304 на 12-е сут культивирования на поверхности коллагенового геля сформировали монослой; наблюдается миграция отдельных клеток внутрь геля. На поверхности геля выявлено формирование клетками капилляроподобной структуры.

Влияние рекомбинантного белка Dll4-Fc на формирование капиллярной сети в процессе раневого заживления *in vivo*. В ходе анализа гистологических препаратов биоптатов регенерирующей ткани, полученных через 5 сут после трансплантации, было показано, что число капилляров на площади 1 мм² в экспериментальной группе “ЭД + HUVEC + Dll4-Fc” статистически значимо отличалось от контроля. Число капилляров при таком сочетании компонентов было значительно больше по сравнению с группой контроля, в которой наблюдали процессы спон-

танного заживления (рис. 3). Какого-либо непосредственного влияния самого Dll4-Fc в комбинации “ЭД + Dll4-Fc” не выявлено. Анализ гистологических препаратов биоптатов, полученных через 10 сут после трансплантации, показал, что на 10-е сут капилляров было больше, чем на 5-е сут, и во всех группах стало примерно одинаковым (рис. 3), т.е. ангиогенез в экспериментальных группах на этом сроке уже не имел отличий от контрольной группы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Сигнальный путь Notch представляет собой эволюционно консервативный сигнальный путь, который регулирует различные клеточные процессы — пролиферацию, дифференцировку, миграцию и клеточную смерть. Dll4/Notch-сигналинг — многофакторный процесс, регулирующий несколько этапов ангиогенеза (Suchting et al., 2007). Вариабельность ответа на активацию Notch зависит от нескольких факторов, например, концентрации лиганда и рецептора, клеточного типа и окружения. Важную роль в ответе клеток на лиганд Dll4 играет положение клеток относительно друг друга, так как этот лиганд является трансмембранным белком, а активация рецепторов Notch происходит при непосредственном контакте клеток друг с другом (Benedito et al., 2009). В условиях 2D-культивирования эндотелиальные клетки представляют собой монослойную культуру,

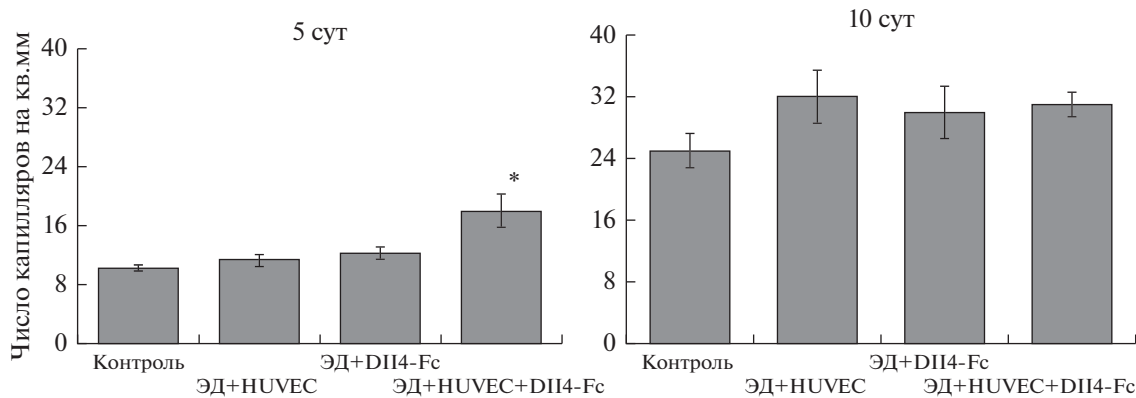


Рис. 3. Влияние различных комбинаций ЭД с клетками линии HUVES и 100 нг/мл DII4-Fc на формирование капиллярной сети на 5-е и 10-е сут в процессе раневого заживления *in vivo*. Показано число капилляров на 1 мм² (среднеарифметическое значение и его стандартная ошибка). Видно увеличение ангиогенеза на 5-е сут в группе с “ЭД + HUVES + DII4-Fc”. Ангиогенез в экспериментальных группах на 10-е сут не имел значимых отличий от контрольной группы. Звездочка показывает достоверность отличия от контроля при $P < 0.05$ (по *t*-критерию Стьюдента).

и их функциональная активность может значительно отличаться от таковой в условиях *in vivo*.

Нами были получены результаты, которые свидетельствуют о том, что в условиях 2D-культивирования ингибитор DII4/Notch сигнального пути растворимый рекомбинантный белок DII4-Fc (100 и 200 нг/мл) не оказывает влияния на пролиферативную и миграционную активность эндотелиальных клеток линий HUVES-56 и ECV-304. Полученные данные не противоречат тому, что описано в литературе.

В результате исследований влияния рекомбинантного белка DII4-Fc на клетки линии ECV-304 в условиях 3D-культивирования на поверхности коллагенового геля было выявлено формирование клетками капилляроподобных структур. Эти данные могут свидетельствовать о том, что ингибирование DII4/Notch-сигналинга с использованием растворимого рекомбинантного белка DII4-Fc может позитивно сказаться на способности эндотелиальных клеток организовывать сосудистые структуры и, тем самым, способствовать прорастанию сосудистых структур. Рядом авторов также было показано, что эндотелиальные клетки формируют капилляроподобные структуры при использовании различных матриц, таких как фибриновые гели, коллаген-глицозамингликановые скаффолды, матрицы на основе полиэтиленгликоля и гиалуроновой кислоты (Montano et al., 2010; Chwalek et al., 2014).

В результате исследования влияния белка DII4-Fc, содержащегося в составе ЭД, на формирование капиллярной сети в процессе заживления ран у крыс наблюдается усиление ангиогенеза уже на 5-е сут в группе с нанесением ЭД совместно с эндотелиоцитами и белком DII4-Fc. Можно предположить, что внесение в рану именно комбинации всех трех компонентов (ЭД, HUVES и DII4-Fc) оказывает влияние

на ускорение формирования капилляров, что можно видеть по гистологии биоптатов, взятых на 5-е сут. К 10-м суткам число капилляров выросло во всех группах, при этом ангиогенез в контроле и в экспериментальных группах был равнозначным. Следует отметить, что спонтанное заживление кожных поврежденных у крыс в норме происходит на 10–14-е сут.

Использование клеточных продуктов при различных осложнениях может оказаться мало эффективным из-за недостатка ростовых факторов, кислорода и привносимых питательных веществ. Ускорение формирования и нормального функционирования кровеносных капилляров в поврежденной области в таких случаях может оказаться необходимым условием для эффективной репарации поврежденной ткани.

Известно, что DII4-Fc способен стимулировать ангиогенез в области раневого заживления (Trindade et al., 2012), а также, что эндотелиальные клетки оказывают позитивное влияние на процессы образования капиллярных структур при включении их в клеточные продукты (Tremblay et al., 2005), однако позитивное влияние применения клеточного продукта ЭД в комбинации с эндотелиальными клетками и DII4-Fc на процессы образования сосудов в области заживления было показано впервые.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-29-04852/15-офи-м).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Блинова М.И., Юдинцева Н.М., Александрова О.И., Баллюзек М.Ф., Хабарова И.Г., Маркин С.М., Чагунава О.Л. 2015. Клинический опыт заживления трофических язв с использованием клеточного продукта “Эквивалент дермальный ЭД”. Хирургические болезни. 4 (5) :

- 690–695. (Blinova M.I., Yuditceva N.M., Aleksandrova O.I., Ballusec M.F., Chabarova I.G., Markin S.M., Chagunava O.L. 2015. Clinical experience in the healing of trophic ulcers using the cell-based product “Dermal equivalent DE”. *Surgical Diseases*. 4 (5) : 690–695.)
- Зорин В.Л., Зорина А.И., Черкасов В.Р. 2009. Анализ зарубежного рынка регенеративной медицины. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 4 (3): 68–78. (Zorin V.L., Zorina A.I., Cherkasov V.R. 2009. Analysis of a foreign market of regenerative medicine. *Cell. Transplant. Tiss. Eng.* 4 (3): 68–78.)
- Зорин В.Л., Черкасов В.Р., Зорина А.И., Деев Р.В. 2010. Характеристика мирового рынка клеточных технологий. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 5 (3): 96–115. (Zorin V.L., Cherkasov V.R., Zorina A.I., Deev R.V. 2010. The characteristics of world market cell technologies. *Cell. Transplant. Tiss. Eng.* 5 (3) : 96–115.)
- Мжаванадзе Н.Д., Бозо И.Я., Калинин Р.Е., Деев Р.В. 2012. Реалии и перспективы применения генной терапии в сердечно-сосудистой хирургии. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 7 (2) : 58–62. (Mzhavanadze N.D., Bozo I.Y., Kalinin R.E., Deev R.V. 2012. Realities and prospects of gene therapy in cardiovascular surgery. *Cell. Transplant. Tiss. Eng.* 7 : 58–62.)
- Benedito R., Roca C., Sörensen I., Adams S., Gossler A., Fruttiger M., Adams R.H. 2009. The Notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell*. 137 (6) : 1124–1135.
- Chandrakasan G., Torchia D.A., Piez K.A. 1976. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution. *J. Biol. Chem.* 251 : 6062–6067.
- Chwalek K., Tsurkan M.V., Freudenberg U., Werner C. 2014. Glycosaminoglycan-based hydrogels to modulate heterocellular communication in *in vitro* angiogenesis models. *Sci. Rep.* 4 : 4414. doi 10.1038/srep04414
- Folkman J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New Eng. J. Med.* 285 : 1182–1186.
- Groeber F., Engelhardt L., Lange J., Kurdyn S., Schmid F.F., Rücker C., Mielke S., Walles H., Hansmann J. 2016. A first vascularized skin equivalent as an alternative to animal experimentation. *Altex*. 33 : 415–422.
- Johnson K.E., Wilgus T.A. 2014. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the regulation of cutaneous wound repair. *Adv. Wound Care*. 3 : 647–661.
- Jojovic M., Wolf F., Mangold U. 1998. Epidermal growth factor, vascular endothelial growth factor and progesterone promote placental development in rat whole-embryo culture. *Anat. Embryol.* 198 : 133–139.
- Lobov I.B., Cheung E., Wudali R., Cao J., Halasz G., Wei Y., Economides A., Lin H.C., Papadopoulos N., Yancopoulos G.D., Wiegand S.J. 2011. The Dll4/notch pathway controls postangiogenic blood vessel remodeling and regression by modulating vasoconstriction and blood flow. *Blood*. 117 : 6728–6737.
- Lobov I., Mikhailova N. 2018. The role of Dll4/Notch signaling in normal and pathological ocular angiogenesis: Dll4 controls blood vessel sprouting and vessel remodeling in normal and pathological conditions. *J. Ophthalmol.* 2018. doi 10.1155/2018/3565292
- Lobov I.B., Renard R.A., Papadopoulos N., Gale N.W., Thurston G., Yancopoulos G.D., Wiegand S.J. 2007. Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104 : 3219–3224.
- Montaño I., Schiestl C., Schneider J., Pontiggia L., Luginbühl J., Biedermann T., Böttcher-Haberzeth S., BrazJulis E., Meuli M., Reichmann E. 2010. Formation of human capillaries *in vitro*: the engineering of prevascularized matrices. *Tiss. Eng. (A)*, 16 : 269–282.
- Noguera-Troise I., Daly C., Papadopoulos N.J., Coetzee S., Bolland P., Gale N.W., Lin H.C., Yancopoulos G.D., Thurston G. 2006. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature*. 444 : 1032–1037.
- Rizzo P., Mele D., Caliceti C., Pannella M., Fortini C., Clementz A.G., Morelli M.B., Aquila G., Ameri P., Ferrari R. 2014. The role of Notch in the cardiovascular system: potential adverse effects of investigational notch inhibitors. *Front. Oncol.* 4: 384. doi 10.3389/fonc.2014.00384
- Schneet J.S., Jiang W., Kumar S.R., Krasnoperov V., Trindade A., Benedito R., Djokovic D., Borges C., Ley E.J., Duarte A., Gill P.S. 2007. Inhibition of Dll4-mediated signaling induces proliferation of immature vessels and results in poor tissue perfusion. *Blood*. 109 : 4753–4760.
- Schrementi M.E., Ranzer M.J., Dipietro L.A. 2017. Impaired wound repair and delayed angiogenesis. In: Farage M., Miller K., Maibach H. (Eds). *Textbook of Aging Skin*. Berlin, Heidelberg: Springer. 1003–1015. doi 10.1007/978-3-662-47398-6_85
- Shing Y., Folkman J., Sullivan R., Butterfield C., Murray J., Klagsbrun M. 1984. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science*. 223: 1296–1299.
- Suchting S., Freitas C., le Noble F., Benedito R., Bréant C., Duarte A., Eichmann A. 2007. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104 : 3225–3230.
- Tremblay P.L., Hudon V., Berthod F., Germain L., Auger F.A. 2005. Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice. *Am. J. Transplant.* 5 : 1002–1010.
- Trindade A., Djokovic D., Gigante J., Badenes M., Pedrosa A.R., Fernandes A.C., Lopes-da-Costa L., Krasnoperov V., Liu R., Gill P.S., Duarte A. 2012. Low-dosage inhibition of DLL4 signaling promotes wound healing by inducing functional neo-angiogenesis. *PLoS One*. 7 (1). doi 10.1371/journal.pone.0029863

EFFECT OF A RECOMBINANT SOLUBLE DLL4-Fc ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF ENDOTHELIAL CELLS *IN VITRO* AND VASCULARIZATION *IN VIVO*

J. I. Khorolskaya^{a,*}, O. I. Aleksandrova^a, I. A. Samusenko^b, N. A. Mikhailova^a, I. B. Lobov^a,
N. M. Yudintceva^a, and M. I. Blinova^a

^a*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, Russia*

^b*Federal State Budgetary Institute "The Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine" The Ministry of Russian Federation for Civil Defense, St. Petersburg, 194044, Russia*

**E-mail: juliya_khorolskaya@mail.ru*

It is well known, that the restoration of the microvasculature system is obligatory during of wound healing processes. Increased angiogenesis in damaged tissue can positively affect the speed and quality of its recovery. In this study, the role of soluble recombinant protein DLL4-Fc in functional activity of HUVEC, HUVEC-56 and ECV-304 in a two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) culture system *in vitro* and capillary network formation during wound healing in rats *in vivo* was investigated. The aim is the possible use of DLL4-Fc in the development of biomedical cell-based products, which could stimulate the growth of blood vessels in damaged organs and tissues. It was shown that in 2D-cultivation system DLL4-Fc does not affect the proliferative and migratory activity of endothelial cells. However, the positive effect of DLL4-Fc on the morphology of the endothelial cell layer and the formation of capillary-like structures was revealed in 3D-cultivation system with ECV-304 cells on the surface of a collagen gel. For the first time, the positive effect of the use of "Equivalent dermal ED" in a composition with HUVEC and DLL4-Fc on the formation of vessels *in vivo* during the healing process was shown.

Keywords: Notch signaling, DLL4-Fc protein, angiogenesis, endothelial cells, dermal fibroblasts, dermal equivalent, tissue engineering