

УДК 616-006.32:575

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2023-8-4-37-53>

КОЛОНИЕФОРМИРУЮЩИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ – КАНДИДАТНАЯ КУЛЬТУРА ДЛЯ ТКАНЕВОЙ СОСУДИСТОЙ ИНЖЕНЕРИИ: ПАСПОРТ ГЕННОГО И ПРОТЕОМНОГО ПРОФИЛЯ

ХАНОВА М. Ю.*, КУТИХИН А. Г., МАТВЕЕВА В. Г., ВЕЛИКАНОВА Е. А., КРИВКИНА Е. О., АНТОНОВА Л. В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Резюме

Цель. Валидация культуры колониеформирующих эндотелиальных клеток (КФЭК) в качестве кандидатной культуры для тканевой сосудистой инженерии на основе сравнительного анализа протеомного профиля и профиля генной экспрессии с сравнением культурами эндотелиальных клеток пупочной вены человека (human umbilical vein endothelial cells HUVEC) и эндотелиальных клеток коронарной артерии человека (human coronary artery endothelial cells, HCAEC).

Материалы и методы. Культура КФЭК получена культивированием мононуклеаров периферической крови от пациентов с ишемической болезнью сердца. В качестве контроля взята коммерческая культура HCAEC, произведённая фирмой Cell Applications и культура HUVEC, полученная по адаптированному протоколу Jaffe.

Для выделения тотальной РНК клетки лизировали тризолом и обрабатывали ДНКазой. ДНК-библиотеки количественно определяли с помощью количественной полимеразной цепной реакции. Библиотеки ДНК эквимолярно смешивали и секвенировали на HiSeq 2000 (Illumina) с длиной парно-концевых прочтений 2×125 нуклеотидов.

Традиционный иммуноблоттинг с применением панэндотелиальных маркеров CD31, vWF, VEGFR2/KDR, маркера эндотелиальных клеток-предшественников CD34, маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода Snail+Slug,

маркеров спецификации эндотелиальной дифференцировки: артериальной HEY2, венозной COUP-TFII и лимфатической LYVE1, VEGFR2. Дот-блоттинг 55 секретируемых белков, связанных с ангиогенезом, выполняли с использованием набора (Human Angiogenesis Array Kit, R&D Systems), в соответствии с протоколом производителя.

Результаты. КФЭК сверхэкспрессирует маркеры всех трех линий эндотелиальной дифференцировки (KDR, VWF, CD34, NRP2, FLT4 и LYVE1 по сравнению с HCAEC; NOTCH4, DLL2) и LYVE1 по сравнению с HUVEC). Протеомное профилирование подтверждает промежуточную эндотелиальную спецификацию КФЭК по сравнению с HCAEC и HUVEC в отношении экспрессии HEY2, LYVE1, VEGFR3, Snail и Slug. Выявлено 261 дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) между КФЭК и HUVEC, и 470 ДЭГ между КФЭК и HCAEC.

Заключение. Базовый профиль генной экспрессии колониеформирующих эндотелиальных клеток соответствует зрелым эндотелиальным клеткам и свидетельствует о промежуточной эндотелиальной спецификации КФЭК, может быть рекомендована для тканевой сосудистой инженерии.

Ключевые слова: колониеформирующие эндотелиальные клетки, генный профиль, протеомный профиль, полнотранскриптомное секвенирование

Для цитирования:

Ханова М. Ю., Кутихин А. Г., Матвеева В. Г., Великанова Е. А., Кривкина Е. О., Антонова Л. В. Колониеформирующие эндотелиальные клетки – кандидатная культура для тканевой сосудистой инженерии: паспорт генного и протеомного профиля. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2023;8(4): 37-53. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2023-8-4-37-53>

*Корреспонденцию адресовать:

Ханова Марьям Юрисовна, 650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6, E-mail: khanovam@gmail.com

© Ханова М. Ю. и др.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования

Исследование выполнено в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0001 «Молекулярные, клеточные и биомехани-

ческие механизмы патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний в разработке новых методов лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы на основе персонифицированной фармакотерапии, внедрения малоинвазивных медицинских изделий, биоматериалов и тканеинженерных имплантатов», № госрегистрации 122011900095-2 от 19.01.2022.

ORIGINAL RESEARCH

COLONY-FORMING ENDOTHELIAL CELLS – CANDIDATE CULTURE FOR TISSUE VASCULAR ENGINEERING: THE GENE AND PROTEOMIC PROFILE

MARIAM YU. KHANOVA*, ANTON G. KUTIKHIN, VERA G. MATVEEVA, ELENA A. VELIKANOVA, EVGENIYA O. KRIVKINA, LARISA V. ANTONOVA

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

English ►**Abstract**

Aim. To validate ECFC culture as a candidate culture for vascular tissue engineering using comparative analysis of the proteomic and gene expression profiles in comparison with cultures of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and human coronary artery endothelial cells (HCAEC).

Materials and Methods. ECFC culture was obtained by cultivating peripheral blood mononuclear cells of patients with coronary artery disease. Commercial HCAECs produced by Cell Applications, and HUVECs cultured according to the modified protocol of Jaffe were used as controls.

The cells were lysed with TRIzol, and total RNA was isolated using a Purelink RNA Micro Scale Kit with concomitant DNase treatment. Next, rRNA depletion was carried out, followed by the creation of DNA libraries. DNA libraries were quantified using quantitative polymerase chain reaction on a CFX96 Touch Bio-Rad amplifier. DNA libraries were equimolarly mixed and sequenced on HiSeq 2000 (Illumina) with a paired-end reads of 2×125 nucleotides.

Conventional western blotting was performed

using pan-endothelial markers CD31, vWF, VEGFR2/KDR, marker of endothelial progenitor cells CD34, markers of epithelial-mesenchymal transition Snail and Slug, and markers of endothelial specification: arterial HEY2, venous COUP-TFII and lymphatic LYVE1, VEGFR2. Dot blotting against 55 angiogenesis-related proteins was performed using Proteome Profiler Human Angiogenesis Array Kit in accordance with the manufacturer's protocol.

Results. ECFC overexpresses markers of all three endothelial lineages (KDR, VWF, CD34, NRP2, FLT4 and LYVE1 compared to HCAEC; NOTCH4, DLL2) and LYVE1 compared to HUVEC. Proteomic profiling indicated ECFC as an intermediate population between HCAEC and HUVEC in term of the expression of HEY2, LYVE1, VEGFR3, Snail and Slug. 261 DEGs were detected between ECFC and HUVEC, and 470 DEGs between ECFC and HCAEC.

Conclusion. The gene expression profile of endothelial colony-forming cells corresponds to mature endothelial cells and indicates ECFC as an intermediate population between HCAEC and HU-

For citation:

Mariam Yu. Khanova, Anton G. Kutikhin, Vera G. Matveeva, Elena A. Velikanova, Evgeniya O. Krivkina, Larisa V. Antonova. Colony-forming endothelial cells – candidate culture for tissue vascular engineering: the gene and proteomic profile. *Fundamental and Clinical Medicine*. (In Russ.). 2023;8(4): 37-53. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2023-8-4-37-53>

***Corresponding author:**

Dr. Mariam Yu. Khanova, 6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation, E-mail: khanovam@gmail.com

© Mariam Yu. Khanova, et al

VEC. ECFC culture can be recommended for tissue vascular engineering.

Keywords: endothelial colony-forming cells, gene profile, proteomic profile, transcriptome profiling, RNA-seq

Conflict of Interest

None declared.

Funding

This research was funded by the Complex Program of Basic Research under the Siberian Branch

of the Russian Academy of Sciences within the Basic Research Topic of Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases № 0419-2022-0001 «Discovering molecular, cellular and biomechanical mechanisms of cardiovascular diseases to develop novel approaches for their treatment, including personalised pharmacotherapy, minimally invasive surgery, composite biomaterials, and tissue-engineered cardiovascular implants».

Введение

Одним из подходов тканевой сосудистой инженерии является создание сосудистых протезов с воссозданным эндотелиальным слоем *in vitro*. Эндотелиальные клетки (ЭК) выстилают сосуды и органы, и формируют цельную динамическую границу раздела ткань – кровь, и участвуют в физиологической регуляции барьерной функции сосудов, гемостазе и контроле сосудистого тонуса [1]. Непрерывная и функционально активная эндотелиальная выстилка является критичным фактором, формирующим долгосрочную проходимость протезируемого сосудистого протеза [2, 3].

Тканевая сосудистая инженерия находится в поиске перспективной эндотелиальной культуры, обладающей высоким пролиферативным потенциалом. Для применения рассматривается культура колониеформирующих эндотелиальных клеток (КФЭК), так как выявлено прямое участие данных клеток в процессе неоваскуляризации путем включения в сосудистую сеть [4, 5, 6, 7]. Эта культура формируется из эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК), которые могут быть получены из мононуклеарной фракции периферической и пуповинной крови при культивировании в селективных эндотелиальных средах [8]. Возросший интерес к ЭПК привел к тому, что результаты различных исследований не сопоставимы из-за гетерогенности ЭПК. Первоначально выделяли 2 субпопуляции – ранние и поздние ЭПК, в зависимости от времени их появления в культуре: ранние ЭПК появляются через 3–5 дней в культуре, тогда как поздние ЭПК появляются через 2–3 недели культивирования [9]. Консенсус в отношении гипотезы происхождения, фенотипа, единообразия маркеров идентификации не достигнут, что затрудняет интерпретацию множества исследований. Тем не менее научное со-

общество попыталось преодолеть путаницу и развести субпопуляции [10]. Ранние ЭПК являются миелоидными ангиогенными клетками, определяются как культивируемые клетки, полученные из мононуклеарных клеток периферической крови, выращенных в условиях культивирования эндотелиальных клеток, и характеризуются иммунофенотипом: CD45+, CD14+, CD31+, CD146–, CD133–, Tie2–. Эти клетки не дифференцируются в эндотелиальные клетки, но способствуют ангиогенезу, оказывая паракринный эффект [11]. Поздние ЭПК в настоящее время более известны как эндотелиальные колониеобразующие клетки (КФЭК) и представляют собой тип эндотелиальных клеток с высокой ангиогенной способностью, характеризуются иммунофенотипом CD34+, CD31+, CD133+ CD45–, CD14–, CD115– и способностью вносить вклад в восстановление сосудов поврежденного эндотелия, а также в образование кровеносных сосудов *de novo* [7, 10].

Эндотелиальная гетерогенность тесно связана со специфическими функциями органов и тканей. Выделяют 4 типа спецификации эндотелиальных клеток: артериальные, венозные, микрососудистые и лимфатические. В свою очередь, микрососудистый эндотелий детерминирован при органоспецифической дифференцировке [12, 13]. Маркерами артериальной спецификации являются экспрессия EphB2, нейропилина-1 (NRP1), маркеров семейства Notch, таких как Notch1-4 и их рецепторов, тогда как венозный эндотелий характеризуется присутствием EphrinB4, NRP2 и фактора транскрипции COUP-TFII (также известный, как NR2F2) [14].

Анализ единичных клеток RNA-seq сердца человека также выявила несколько подтипов ЭК, включая артериальные ЭК (экспрессирующие HEY1, DKK2 и EFNB2), венозные

ЭК (экспрессирующие ACKR1 и NR2F2), капиллярные ЭК (экспрессирующие BTNL9 и CD36), лимфатические ЭК (экспрессирующие CCL21 и PROX1) и эндокардиальные ЭК (экспрессирующие NRG3 и PCDH15) [15]. С помощью секвенирования одноклеточной РНК (scRNA-seq) была совершена попытка выявить специфические маркеры КФЭК. Были выявлены высокие уровни экспрессии костного морфогенетического белка 2 и 4 (BMP2 и BMP4) и EphrinB2 (EFNB2) по сравнению с HUVEC [16]. Эти молекулы важны для эмбрионального ангиогенеза, клеточной адгезии и миграции [17]. КФЭК и HUVEC обладают высокой экспрессией нейропиллина 1 (NRP1) и сосудистого эндотелиального фактора роста С (VEGF-C), важных факторов для дифференцировки эндотелиальных предшественников [16, 18]. Было продемонстрировано, что как BMP2, так и BMP4 экспрессируются исключительно КФЭК, и они необходимы для ангиогенного потенциала КФЭК [19]. Под влиянием напряжения сдвига у ЭПК выявлена активация экспрессии мРНК маркеров артериальных эндотелиальных клеток NOTCH1, NOTCH3, HEY1 и EphA2 и снижение экспрессии мРНК маркеров венозных эндотелиальных клеток EphA2 и NRP2 [20].

Несоответствие применения фенотипически и функционально различных клеток при разработке биомедицинских изделий подтипа может повлиять на клиническую эффективность. Такое предположение основывается на результатах реконструкции артериального русла венозным трансплантатом. Несмотря на то, что трансплантаты подкожной вены являются аутологичными и иммунологически совместимыми, они претерпевают аномальное ремоделирование, что отражается в развитии чрезмерной гиперплазии неоинтимы, которая приводит к ухудшению клинической эффективности. Предположительно это связано с ограниченной способностью адаптации терминально дифференцированных венозных ЭК в артериальной среде [21, 22].

Помимо общих требований (возможность получения достаточной клеточной массы, неиммуногенность) применения аутологичной культуры ЭК для заселения, необходимо поддерживать соблюдение соответствия имплантируемых ЭК и сосудистым руслом, в которое выполняется протезирование. Так как правильный выбор идеального источника кле-

ток для посева считается ключевым фактором успешного процесса презентелизации сосудистого протеза [23].

В нашем предыдущем исследовании культура КФЭК, полученная при культивировании мононуклеаров периферической крови, характеризовалась эндотелиальным фенотипом, способностью формировать тубулярные структуры и высокой пролиферативной активностью. Тем не менее, существует необходимость проведения полной валидации культуры КФЭК [24, 25].

Цель исследования

Валидация культуры КФЭК в качестве кандидатной культуры для тканевой сосудистой инженерии на основе сравнительного анализа протеомного профиля и профиля генной экспрессии в сравнении с культурами эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) и эндотелиальных клеток коронарной артерии человека (HCAEC).

Материалы и методы

Дизайн исследования был одобрен локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ. Все пациенты подписали протокол информированного согласия на участие в исследовании.

Культура колониеформирующих эндотелиальных клеток (КФЭК) была получена путем культивирования мононуклеарной фракции, выделенной из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца в питательной среде EGM-2 MV (Lonza, Швейцария) с 5 % эмбриональной бычьей сывороткой (Hyclone, США) по адаптированному протоколу [9].

Эндотелиальные клетки из пупочной вены человека (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) были выделены с использованием коллагеназы (Thermo Scientific, США) и высеваны на культуральные флаконы, покрытые коллагеном по адаптированному протоколу Jaffe E.A. et al. [10]. Клетки культивировали в полной питательной среде EGM-2 (Lonza, Швеция) с 10 % содержанием эмбриональной бычьей сыворотки (Hyclone, США).

Культура первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека (human coronary artery endothelial cells, HCAEC) является коммерческим продуктом (Cell Applications, США). Согласно информации производителя, первичные эндотелиальные

клетки человека были получены из артерий здоровых доноров с криоконсервацией на втором пассаже. Клетки размораживали и культивировали согласно рекомендациям производителя в среде для роста клеток MesoEndo Cell Growth Medium (Cell Applications, США).

Протеомное профилирование эндотелиальных клеток

Культуры КФЭК, НСАЕС и HUVEC (по 2 планшета 75 см² на группу) отмывали от питательной среды ледяным фосфатно-солевым буфером, клетки лизировали RIPA-буфером (89901, Thermo Scientific, США) и измеряли общую концентрацию белка с помощью набора Pierce BCA Protein Assay Kit (23227, Thermo Scientific, США). Образцы белка (15 мкг на образец) смешивали с буфером для образцов NuPAGE LDS (NP0008, Invitrogen, США) и восстанавливающим агентом для образцов NuPAGE (NP0004, Invitrogen, США), денатурировали при 99°C в течение 5 минут, загружали в 10-луночный гель NuPAGE 4–12 % Bis-Tris толщиной 1,5 мм (NP0335, Invitrogen, США). Разделение белков проводили электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в буфере NuPAGE MES SDS (NP000202, Invitrogen, США), содержащем антиоксидант NuPAGE (NP0005, Invitrogen, США), при 150 В в течение 1,5 часа. Смесь 1:1 предварительно окрашенного белкового стандарта Novex Sharp (LC5800, Invitrogen, США), смешанного с MagicMark XP Western Protein Standard (LC5602, Invitrogen, США), использовали в качестве маркера размера молекулярной массы.

Перенос сухого белка проводили по стандартному 7-минутному протоколу с использованием поливинилиденфториды iBlot 2 Transfer Stacks (IB24001, Invitrogen, США) и устройства для переноса геля iBlot 2 (Invitrogen, США). Затем мембраны инкубировали в блокирующем растворе iBind Flex (SLF2020×4, Invitrogen, США) в течение 2 часов, а затем обрабатывали в iBind Western Device (Invitrogen, США) в течение ночи с рекомендованными первичными и вторичными разведениями антител (раствор iBind Flex). Были использованы следующие первичные антитела: мышинные анти-CD31 (ab9498, Abcam), кроличьи анти-VE-кадгерина (36-1900, Invitrogen), кроличьи анти- α WF (ab6994, Abcam), кроличьи анти-VEGFR2/KDR (ab39256, Abcam), кроли-

чий анти-CD34 (ab81289, Abcam), кроличьи анти-нейропипин 1 (ab81321, Abcam), кроличьи антитела-HEY2 (ab221931, Abcam), мышинное антитело против NR2F2/COUP-TFII (ab41859, Abcam), кроличьи анти-LYVE1 (ab14917, Abcam), кроличьи анти-VEGFR3 (ab27278, Abcam), кроличьи антитела против Snail+Slug (ab180714, Abcam), мышинные антитела против N-кадгерина (MA5-15633, Invitrogen) и козий анти- β -тубулин (контроль нагрузки, ab21057, Abcam). Конъюгированные с пероксидазой хрена козы антимышинные (AP130P, Sigma-Aldrich), козы антикроличьи (7074S, Cell Signaling Technology) или ослиные антимышинные (ab205723, Abcam) были использованы в качестве вторичных антител. Детектирование хемилюминесценции проводили путем инкубации мембраны в хемилюминесцентном субстрате SuperSignal West Pico PLUS (34580, Thermo Scientific, США) в течение 1 мин с последующей 12-минутной экспозицией в сканере блотов C-DiGit (LI-COR Biosciences). Денситометрию полученных данных проводили в программе ImageJ (National Institutes of Health).

Для дот-блоттинга выделяли белок аналогично с помощью RIPA-буфера (89901, Thermo Scientific, США). Анализ 55 секретируемых белков, связанных с ангиогенезом, выполняли с использованием профилей протеомных массивов ангиогенеза человека (ARY007, R&D Systems, США), поставляемым с набором для анализа (Human Angiogenesis Array Kit, ARY007, R&D Systems, США), в соответствии с протоколом производителя.

Полнотранскриптомное секвенирование РНК культур КФЭК, НСАЕС и HUVEC

Для полнотранскриптомного секвенирования (RNA-seq) использовали образцы культур КФЭК, НСАЕС и HUVEC в количестве приблизительно 10 млн клеток для каждой культуры.

Исследование было проведено на базе ЦКП «Геномика» (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск).

Клетки были отмыты холодным фосфатно-солевым буфером от среды и лизированы тризолом (15596018, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США) с последующим выделением тотальной РНК при помощи набора Purelink RNA Micro Scale Kit (12183016, Invitrogen,

США) с сопутствующей обработкой ДНКазой (DNASE70, Sigma-Aldrich, США). Качество РНК контролировалось с помощью набора RNA 6000 Pico Kit (5067–1513, Agilent, США) на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent, США) по индексу целостности РНК (RIN). Оценка количества выделенной РНК проводилась на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США) и флуорометре Qubit 4 (Invitrogen, США).

Для 1 мкг выделенной РНК проводилась деплеция рРНК посредством набора RiboCop rRNA Depletion Kit V1.2 (037.96, Lexogen, США) с дальнейшим подготовкой ДНК-библиотек при помощи набора SENSE Total RNA-Seq Library Prep Kit (042.96, Lexogen, США). Каждому образцу РНК был присвоен уникальный штрих-код. Качество полученных ДНК-библиотек анализировалось с помощью набора High Sensitivity DNA Kit (5067–4626, Agilent, США) на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent, США). Концентрация ДНК-библиотек определялась с помощью количественной полимеразной цепной реакции (КПЦР) с детекцией результата в реальном времени на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, США). Далее ДНК-библиотеки смешивались эквимлярно и секвенировались на платформе HiSeq

2000 (Illumina, США) с длиной парно-концевых прочтений 2×125 нуклеотидов.

Значение индекса целостности РНК (RIN), выделенной из исследуемых эндотелиальных культур, во всех случаях было не менее 8 (таблица 1), что свидетельствовало о ее высоком качестве и возможности использования для RNA-seq (рекомендуемое RIN ≥ 7). Количество полученной тотальной РНК во всех образцах составляло не менее 29 мкг, что было более чем достаточным для проведения деплеции рРНК (рекомендуется ≥ 1 мкг). В результате секвенирования ДНК-библиотек были получены парные прочтения длиной 125 нуклеотидов, общий объем которых варьировал в диапазоне 1–4 млрд пар оснований, а покрытие составило 9,5–42,7 млн прочтений. После фильтрации прочтений по качеству и длине, а также удаления адаптеров их количество практически не изменилось. Картирование прочтений библиотек на геном человека показало, что не менее 97,2 % ридов во всех образцах соответствовали геному человека (hg38). При этом большая часть (82,2–93,2 %) прочтений приходилась на экзоны, т. е. белок-кодирующую часть генов.

Полученные прочтения фильтровались по качеству (QV>20), длине (>20), также удаля-

Таблица 1.
Характеристика
ДНК-библиотек, при-
готовленных из РНК
КФЭК, HUVEC и HCAEC
и результаты их
секвенирования.

Table 1.
Characteristics of DNA
libraries prepared
from RNA of CFEC,
HUVEC and HCAEC and
the results of their
sequencing.

Образец / Sample ID	РНК, мкг / RNA, µg	Индекс це- лостности РНК / RNA Integrity Number	Средняя дли- на ДНК-библио- теки, нуклеоти- дов / DNA-library average length, nucleotides	Покрыве- ние, млн ридов / Coverage, million reads	Процент про- чтений (hg38) / Percent of reads mapped to hg 38	Процент про- чтений (экзо- ны) / Percent of reads mapped to exons
КФЭК / CFEC						
P1	48.8	9.7	356	15.7	98.2	84.9
P2	34.0	9.2	354	14.5	98.4	84.5
P3	37.2	9.0	389	42.7	98.2	82.2
P4	31.8	9.4	360	9.5	98.2	84.1
HCAEC						
K1	41.4	9.4	392	25.7	98.3	93.2
K2	32.4	9.5	359	18.5	98.4	88.7
K3	37.8	9.0	360	18.7	98.1	82.5
K4	31.2	9.4	396	10.6	97.2	86.3
HUVEC						
B1	42.0	9.3	483	19.4	98.2	84.7
B2	33.2	9.9	357	13.3	98.4	93.0
B3	33.6	8.7	356	13.3	98.4	91.4
B4	29.0	9.5	358	9.8	98.2	89.0

лись адаптерные последовательности с помощью программы TrimGalore v.0.4.4 (Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Великобритания). После фильтрации среднее количество ридов превышало 10 млн. Их картирование на геном человека (hg38) с аннотацией Ensembl (v.38.93) проводилось с использованием программы CLC GW 11.0 (Qiagen) со следующими параметрами: доля сходства=0.8, доля длины=0.8, стоимость несоответствия=2, стоимость вставки=3, стоимость удаления=3.

Для оценки дифференциальной экспрессии генов (ДЭГ) использовался мультифакторный статистический анализ в программе CLC GW 11.0, основанный на отрицательной биномиальной модели, используемой в программах EdgeR и DESeq2. Статистически значимые ДЭГ были выбраны на основе следующих критериев отсеки: абсолютное кратное изменение ≥ 2 и FDR (частота ложных открытий), значение $p < 0,05$.

Анализ обогащения набора генов на основе «Gene Ontology» проводился в категориях молекулярных функций (Molecular function), биологических процессов (Biological process) и клеточных компонентов (Cellular component) с использованием Gene Set Test в CLC GW. При сравнении групп клеток в рассмотрении принимались категории с поддержкой $p < 0,05$ (FDR) и отношением ДЭГ к общему количеству генов более 50 %.

Результаты

Оценка базового профиля генной экспрессии КФЭК в сравнении с НСАЕС и HUVES

Для полной и объективной оценки базового профиля генной экспрессии КФЭК по сравнению НСАЕС и HUVES было проведено полнотранскриптомное секвенирование (RNA-seq) вышеуказанных культур. НСАЕС дополнительно введена в протокол данного исследования как сертифицированная производителем культура в отличие от культур КФЭК и HUVES, которые мы получали самостоятельно.

Дифференциально экспрессируемые гены

Анализ ДЭГ в отношении их функции в эндотелии показал, что КФЭК в сравнении с НСАЕС обладали более высокой базовой экспрессией генов, кодирующих панэндотелиальные маркеры, такие как рецептор 2 к

сосудистому эндотелиальному фактору роста VEGFR2 (кодируется геном KDR) и фактор фон Виллебранда vWF (кодируется одноименным геном vWF) в 2,2 и 3,9 раза соответственно. КФЭК в сравнении с НСАЕС характеризовались гиперэкспрессией генов COL1A1 и COL1A2 (в 926 и 43,5 раза соответственно), кодирующих α и β цепи коллагена I типа основного белка ВКМ, а также генов COL4A1 и COL4A2 (в 2,5 и 3 раза соответственно), кодирующих α и β цепи основного белка базальной мембраны эндотелия коллагена IV типа. Также КФЭК от НСАЕС отличала ожидаемо более высокая экспрессия в 23,9 раза гена CD34, который является маркером эндотелиальных прогениторных клеток. Интересно, что у КФЭК относительно НСАЕС выявлена более высокая экспрессия маркеров венозной эндотелиальной спецификации (в 7,9 раза, ген NRP2) и лимфатической спецификации, представленными маркерами FLT4 (в 11,6 раза) и LYVE1 (в 45,7 раза), которые кодируются одноименными генами FLT4 и LYVE1. В свою очередь, НСАЕС от КФЭК отличала повышенная экспрессия в 523 раза маркера артериальной эндотелиальной спецификации HEY2, (кодирует транскрипционный фактор Notch-пути), а также гена NOS3 в 4,9 раза (кодирует эндотелиальную синтазу азота 3 типа) и гена FLT1 в 3,9 раза (кодирует VEGFR1).

Сравнение профиля генной экспрессии КФЭК и HUVES выявило у КФЭК повышенную экспрессию артериальных маркеров, таких как ген NOTCH4 в 3,1 раза и ген DLL2 в 4,1 раза, которые кодируют рецептор и лиганд Notch-пути, а также гиперэкспрессию в 18,7 раза маркера лимфатической спецификации LYVE1 и гена COL1A1 в 914 раз. HUVES от КФЭК отличала повышенная экспрессия генов KLF4 в 45 раз (кодирует одноименный эндотелиальный транскрипционный фактор механотрансдукции), CDH2 – в 7,6 раза (кодирует маркер мезенхимальных клеток N-кадгерин) и VEGF – в 5 раз (таблица 2).

Анализ обогащения терминов Gene

Ontology дифференциально экспрессируемых генов

Анализ полученных данных при помощи биоинформатического инструмента Gene Ontology в категории Молекулярные функции

Таблица 2.

Дифференциальная экспрессия генов, идентифицированных в КФЭК, по сравнению с HCAEC и HUVEC, после применения порогового значения критерий (значение FDR $p < 0,05$, fold change – кратность изменения уровня экспрессии гена ≥ 2).

Table 2.

The differential expression of genes identified in CFEC compared to HCAEC and HUVEC, after applying a cut-off criterion (FDR p value < 0.05 , fold change in gene expression level ≥ 2).

Обозначение гена / Gene symbole	Кодируемый геном белок / Description	Хромосома / Chromosome	Степень количественного изменения / Log ₂ fold change	Кратность изменения / Fold change	Уровень значимости p-value / Significance level p-value	Значение частоты ложных обнаружений / FDR p-value	Идентификатор гена / ENSEMBL gene ID
КФЭК в сравнении с HCAEC / CFEC versus HUVEC							
COL1A1	Субъединица A1 основного коллагена I типа ВКМ / subunit A1 of collagen type I of major component of the extracellular matrix	17	9,855	926,144	2,586x10 ⁻⁵	0,004	ENSG00000108821
LYVE1	Маркер лимфатической дифференцировки / lymphatic endothelial lineage markers	11	5,515	45,740	7,398x10 ⁻¹⁰	3,400x10 ⁻⁷	ENSG00000133800
COL1A2	Субъединица A2 основного коллагена I типа ВКМ / subunit A2 of collagen type I of major component of the extracellular matrix	7	5,443	43,504	1,231x10 ⁻⁶	0,001	ENSG00000164692
CD34	Маркер эндотелиальных прогениторных клеток / endothelial progenitor cell marker	1	4,581	23,936	0	0	ENSG00000174059
FLT4	Маркер лимфатической дифференцировки, кодирует VEGFR3 / lymphatic endothelial lineage markers, encodes VEGFR3	5	3,538	11,616	0	0	ENSG00000037280
NRP2	Маркер венозной дифференцировки / venous endothelial specification marker	2	2,985	7,920	0	0	ENSG00000118257
VWF	Панэндотелиальный маркер / pan-endothelial markers	12	1,981	3,946	1,912x10 ⁻¹⁰	1,002x10 ⁻⁷	ENSG00000110799
BMP4	Костный морфогенетический белок 4, характерен для ЭПК / bone morphogenetic protein 4/ marker EPC	14	1,773	3,417	9,338x10 ⁻⁸	2,755x10 ⁻⁵	ENSG00000125378

COL4A2	Субъединица A2 основного белка базальной мембраны эндотелия коллагена I типа / subunit A2 of collagen type IV endothelial basement membrane	13	1,562	2,952	7,739x10 ⁻¹³	5,727x10 ⁻¹⁰	ENSG00000134871
COL4A1	Субъединица A1 основного белка базальной мембраны эндотелия коллагена I типа / subunit A1 of collagen type IV endothelial basement membrane	13	1,293	2,450	7,958x10 ⁻¹⁰	3,619x10 ⁻⁷	ENSG00000187498
KDR	Панэндотелиальный маркер, кодирует VEGFR2 / pan-endothelial markers, encodes VEGFR2	4	1,158	2,232	4,885x10 ⁻⁸	1,568x10 ⁻⁵	ENSG00000128052
NOTCH2	Маркер артериальной дифференцировки / arterial endothelial specification marker	1	-1,283	-2,43	1,867x10 ⁻⁶	0,0004	ENSG00000134250
FLT1	Рецептор 1 фактора роста сосудистого эндотелия (VEGFR1) / receptor 1 of vascular endothelial growth factor	13	-1,959	-3,89	3,517x10 ⁻⁸	1,155x10 ⁻⁵	ENSG00000102755
NOS3	Эндотелиальная синтаза азота 3 типа / Endothelial nitric oxide synthase 3	7	-2,305	-4,95	6,462x10 ⁻¹⁴	5,642x10 ⁻¹¹	ENSG00000164867
HEY2	Маркер артериальной дифференцировки / arterial endothelial specification marker	6	-9,030	-522,91	4,521x10 ⁻¹⁰	2,169x10 ⁻⁷	ENSG00000135547
КФЭК в сравнении с HUVEC / CFEC versus HUVEC							
COL1A1	Субъединица A1 основного коллагена I типа ВКМ / subunit A1 of collagen type I of major component of the extracellular matrix	17	9,837	914,625	0,0001	0,028	ENSG00000108821
LYVE1	Маркер лимфатической дифференцировки / lymphatic endothelial lineage markers	11	4,220	18,636	1,971x10 ⁻⁶	0,001	ENSG00000133800

DLL2	Эндотелиальный маркер, является лигандом NOTCH-пути / endothelial marker, ligand of the NOTCH-pathway	15	2,048	4,135	5,053x10 ⁻⁹	3,678x10 ⁻⁶	ENSG00000128917
NOTCH4	Маркер артериальной дифференцировки / arterial endothelial specification marker	6	1,630	3,095	8,118x10 ⁻¹¹	9,58x10 ⁻⁸	ENSG00000204301
VEGFA	Фактор роста эндотелия сосудов A / vascular endothelial growth factor A	6	-2,308	-4,952	1,289x10 ⁻⁵	0,004	ENSG00000112715
CDH2	Маркер мезенхимальных клеток N-кадгерин / Mesenchymal cell marker, encodes N-cadherin	18	-2,933	-7,639	1,138x10 ⁻⁵	0,004	ENSG00000170558
KLF4	Транскрипционный фактор механотрансдукции / transcription factor of mechanotransduction	9	-5,501	-45,286	2,500x10 ⁻⁹	1,864x10 ⁻⁶	ENSG00000136826

(Molecular function) выявил повышенную экспрессию ДЭГ у КФЭК в сравнении с НСАЕС, которые кодируют активность рецепторов к сосудистому эндотелиальному фактору роста (4 ДЭГ из 6 относящихся к термину). При сравнении КФЭК с НСАЕС не обнаружено статистически значимых различий среди категорий генов, кодирующих клеточные компоненты (Cellular component) и отвечающих за биологические процессы (Biological process).

Кроме того, в дополнении к автоматизированному анализу было проведено мануальное аннотирование дифференциально экспрессированных генов в отношении их функций с позиции биологии эндотелия, которое показало, что КФЭК отличала гиперэкспрессия генов, кодирующих белки, задействованных в процессах развития кровеносных сосудов (5 ДЭГ против 0 у НСАЕС), однако в отношении белков, обеспечивающих целостность эндотелиального барьера, у НСАЕС выявлена гиперэкспрессия у большего количества ДЭГ в сравнении с КФЭК (15 ДЭГ против 8).

В то же время сравнение набора генов КФЭК и HUVEC при проведении мануальной аннотации показало у КФЭК гиперэкспрес-

сию в отношении 19 дифференциально экспрессируемых генов, кодирующих проангиогенные белки, в то время у HUVEC выявлено 6 ДЭГов. Также у КФЭК идентифицировано 4 ДЭГов, способствующих миграции ЭК, в сравнении с 0 повышенных у HUVEC.

Базовый профиль дифференциально экспрессированных генов КФЭК, HUVEC и НСАЕС показывает, что культуре КФЭК свойственен усиленный синтез белков базальной мембраны (коллагена IV типа) и внеклеточного матрикса (коллагена I типа). При этом КФЭК экспрессируют маркеры трех направлений эндотелиальной дифференцировки (артериальной, венозной и лимфатической). Вероятно, КФЭК ближе к HUVEC (261 ДЭГ), чем к НСАЕС (470 ДЭГ) (**рисунок 1**). Однако базовый профиль экспрессии КФЭК минимально отличался от НСАЕС и HUVEC, что делает КФЭК подходящей популяцией для создания тканеинженерных сосудистых протезов.

Результаты протеомного профилирования КФЭК в сравнении с НСАЕС и HUVEC

Выборочный анализ панэндотелиальных маркеров методом традиционного иммуноблоттинга подтвердил эндотелиальный фе-

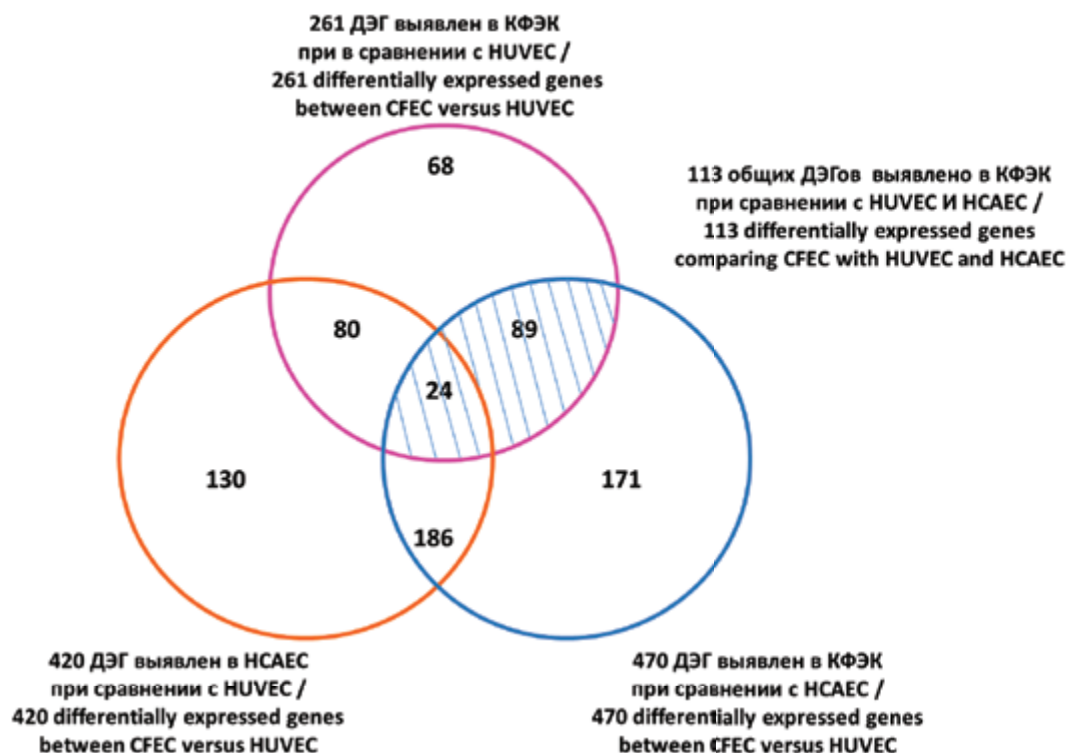


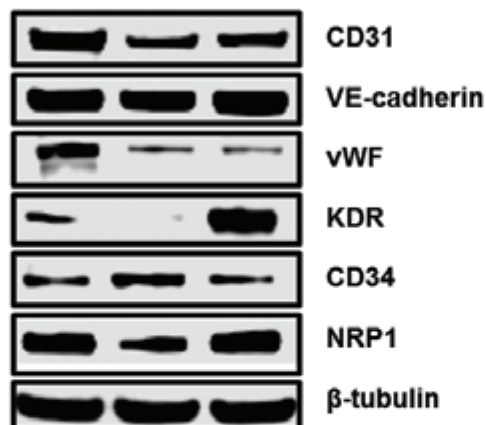
Рисунок 1. Диаграмма Венна дифференциально экспрессируемых генов в популяциях КФЭК, HUVEC и HCAEC.

Figure 1. Venn diagram differentially expressed genes in CFEC, HUVEC and HCAEC.

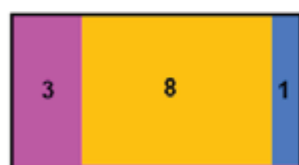
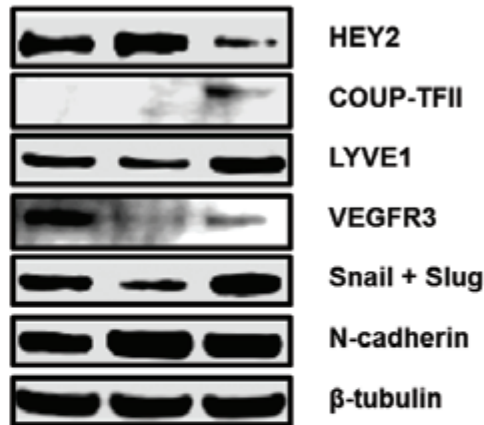
Панэндотелиальные маркеры / Pan-endothelial markers

Маркеры эндотелиальной спецификации и эндотелиально-мезенхимального перехода / Endothelial lineage and EndoMT markers

КФЭК/CFEC HCAEC HUVEC



HCAEC HUVEC



КФЭК/CFEC



HCAEC



HUVEC

Высокий уровень экспрессии / High expression

Средний уровень экспрессии / Intermediate expression

Низкий уровень экспрессии / Low expression

Б

Рисунок 2. Анализ экспрессии панэндотелиальных маркеров, маркеров эндотелиальной спецификации и эндотелиально-мезенхимального перехода в КФЭК в сравнении с HCAEC и HUVEC. А – иммуноблоттинг; Б – количественный подсчет измеренных маркеров эндотелиального фенотипа в отношении их относительной экспрессии в КФЭК, HCAEC и HUVEC.

Figure 2. Analysis of the expression of pan-endothelial markers, markers of endothelial specification and endothelial-mesenchymal transition CFEC in comparison with HCAEC and HUVEC. A – immunoblotting; B – quantification of measured endothelial phenotype markers in terms of their relative expression in CFEC, HCAEC, and HUVEC.

нотип КФЭК, характеризующийся высоким уровнем CD31, VE-кадгерина, KDR/CD309, CD34 и нейропилина-1 (NRP1) (рисунк 2). Профиль экспрессии маркеров эндотелиальной спецификации и эндотелиально-мезенхимального перехода свидетельствовал о переходном фенотипе КФЭК с точки зрения промежуточного уровня маркера артериальной эндотелиальной дифференцировки HEY2, маркеров лимфатической эндотелиальной дифференцировки LYVE1 и VEGFR3 и маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода Snail и Slug по сравнению с HCAEC, которые гиперэкспрессировали HEY2 и по сравнению с HUVEC, которые гиперэкспрессировали маркер венозной эндотелиальной дифференцировки COUP-TFII соответственно.

Для валидации результатов полнотранскриптомного секвенирования РНК, выделенной из КФЭК, HCAEC, HUVEC при помощи дот-блоттинга были измерены уровни 55 ангиогенных белков (рисунк 3). Для КФЭК была характерна выраженная экспрессия 4 проангиогенных факторов: фактора свертывания крови 3 (TF), гепарин-связывающего EGF-подобного фактора роста (HB-EGF), интерлейкина-8

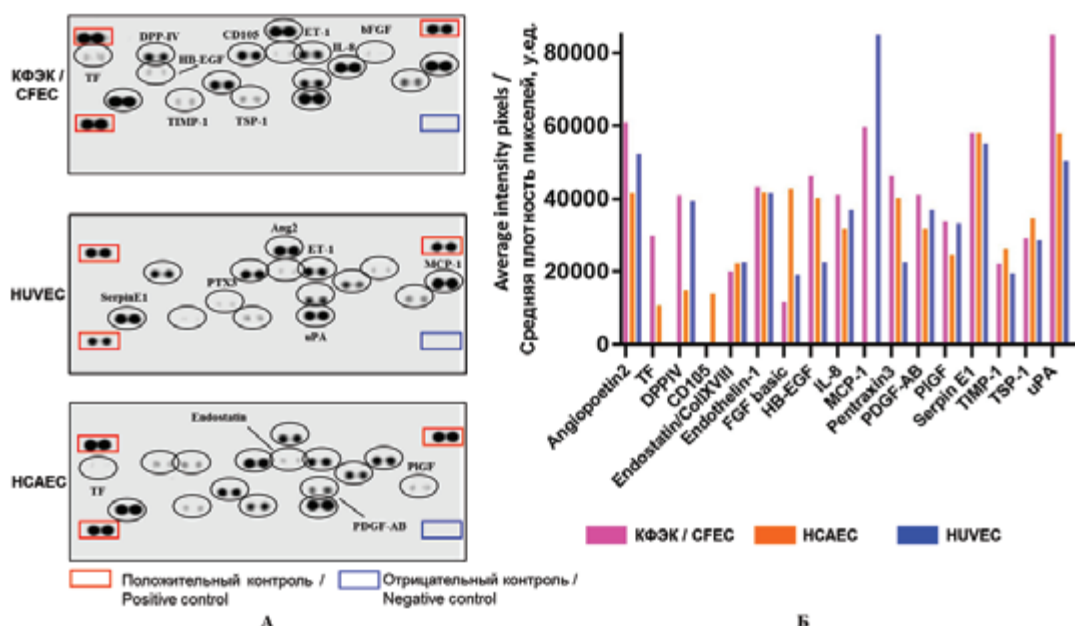
(IL-8), урокиназного активатора плазминогена (uPA), и антиангиогенной молекулы ангиопоэтина-2 (Ang-2), относительно аналогичных белков в других культурах. Уровень экспрессии 10 белков был характерен для всех трех исследуемых эндотелиальных культур и не имел выраженных отличий среди проангиогенных белков таких как: дипептидилпептидаза-4 (DPPIV), эндоглин (CD105), эндотелин-1 (ET-1), интерлейкин-8 (IL-8), тромбоцитарный фактор роста AA/BB (PDGF-AB/PDGF-BB), плацентарный фактор роста (PIGF), ингибитор-1 активатора плазминогена (Sepine E1), так и среди антиангиогенных: эндостатин/коллаген 18 (Endostatin/CollXVIII), тканевой ингибитор металлопротеиназ-1 (TIMP-1), тромбоспондин-1 (TSP-1). HCAEC отличала высокая экспрессия основного фактора роста фибробластов 2 (FGF basic) в 2 раза относительно других культур, а также экспрессия эпидермального фактора роста (EGF), которая выявлена исключительно у HCAEC. Уровень экспрессии моноцитарного хемотаксического белка 1 (MCP-1) варьировал среди исследуемых культур, так наибольший уровень экспрессии выявлен у HUVEC, который превы-

Рисунок 3.

Оценка экспрессии 55 белков, связанных с ангиогенезом человека, в различных эндотелиальных культурах: КФЭК, HCAEC и HUVEC. А – репрезентативные изображения дот-блоттинга; Б – денситометрический анализ измеренных маркеров эндотелиального фенотипа.

Figure 3.

Evaluation of the expression of 55 human angiogenesis-associated proteins in various endothelial cultures: CFEC, HCAEC and HUVEC. A – Representative images of the dot blot; B – Densitometric analysis of measured endothelial phenotype markers.



Примечания: Ang-2 – ангиопоэтин-2; TF – фактор свертывания крови 3; DPPIV – дипептидилпептидаза-4; EGF – эпидермальный фактор роста; CD105 – эндоглин; Endostatin/CollXVIII – эндостатин/коллаген 18; ET-1 – эндотелин-1; bFGF (FGF basic) – фактор роста фибробластов 2; HB-EGF – гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста; IL-8 – интерлейкин-8; MCP-1 – моноцитарный хемотаксический белок 1; PTX3 – пентраксин 3; PDGF-AB/PDGF-BB – фактор роста тромбоцитов AA/BB; PIGF – плацентарный фактор роста; Sepine E1 – ингибитор-1 активатора плазминогена; TIMP-1 – тканевой ингибитор металлопротеиназ-1; TSP-1 – тромбоспондин-1; uPA – урокиназный активатор плазминогена.

Note: Ang-2 – Angiopoietin 2; TF – Coagulation factor III; DPPIV – Dipeptidyl peptidase IV; EGF – Epidermal growth factor; CD105 – endoglin; Endostatin/CollXVIII – Endostatin/Collagen XVIII; ET-1 – Endothelin-1; bFGF (FGF basic) – basic fibroblast growth factor; HB-EGF – Heparin-binding EGF-like growth factor; IL-8 – interleukin-8; MCP-1 – monocyte chemoattractant protein 1; PTX3 – pentraxin 3; PDGF-AB/PDGF-BB – platelet-derived growth factor AA/BB; PIGF – Placental growth factor; Sepine E1 – plasminogen activator inhibitor-1; TIMP-1 – tissue inhibitor of metalloproteinase 1; TSP-1 – thrombospondin 1; uPA – urokinase plasminogen activator.

шал данный показатель в 1,5 раза у КФЭК и полностью отсутствовал у НСАЕС.

Обсуждение

Ангиогенез является сложным многоэтапным процессом, обеспечивающим рост и развитие системы кровообращения за счет пролиферации, миграции и проницаемости ЭК, требующим последовательной активации стимулирующих и ингибирующих сигналов [27]. Ангиогенная способность ЭК является основой формирования неоплазмы. Несмотря на сложность, основным путем, регулирующим ангиогенез, являются факторы роста эндотелия сосудов (VEGF) – ключевой митогенный и хемотаксический фактор и их тирозинкиназные рецепторы. [28] Фактор роста эндотелия сосудов А кодируется одноименным геном VEGFA, индуцирует пролиферацию эндотелиальных клеток, способствует миграции клеток, ингибирует апоптоз и индуцирует проницаемость кровеносных сосудов.

Гены, кодирующие рецепторы к различным формам VEGF, опосредуют его функцию в ЭК. Ген KDR кодирует рецептор VEGFR/CD309 для VEGFA, VEGFC и VEGFD. Играет важную роль в регуляции ангиогенеза, развития сосудов, способствует пролиферации, выживанию, миграции и дифференцировке эндотелиальных клеток [29]. Ген FLT1 кодирует рецептор для VEGFA, VEGFB и к плацентарному фактору роста (PGF) необходим для организации кровеносных сосудов [30, 31]. Ген FLT4 кодирует рецептор к VEGFC и VEGFD, а также участвует в лимфангиогенезе и поддержании лимфатического эндотелия. Способствует пролиферации, выживанию и миграции эндотелиальных клеток и регулирует ангиогенное прорастание [32]. Ген NRP2 кодирует нейропептин-2, член семейства рецепторных белков нейропептинов, рецептор к изоформе VEGF-165, участвует в прорастающем ангиогенезе [33, 34]. Гены NOTCH2 и NOTCH4 кодируют рецептор для лигандов Jagged-1, Jagged-2 и Delta-1, DLL4 представляет собой кодирующий дельта-подобный канонический лиганд 4, является лигандом в сигнальном Notch-пути. Активация Notch-пути приводит к отрицательной регуляции пролиферации и миграции ЭК [35].

Ген KLF4 кодирует транскрипционный фактор. Регулирует экспрессию ключевых факторов транскрипции во время эмбрионального

развития. KLF4 является положительным регулятором сигнального пути VEGF и, таким образом, способствует образованию трубчатых структур через активацию передачи сигналов VEGF [36]. Секретируемый белок BMP4 (костный морфогенетический белок 4), кодируемый геном BMP4, член суперсемейства белков TGF- β (трансформирующий фактор роста- β), который активирует как канонический SMAD-зависимый путь, так и альтернативный путь c-Src путем связывания с рецепторным комплексом BMPR1/BMPR2, фосфорилирование SRC, в свою очередь, активирует VEGFR2, что приводит к ангиогенному ответу [37].

В нашем предыдущем исследовании были получены колониеформирующие эндотелиальные клетки (КФЭК), иммунофенотипированы и исследованы их функциональные свойства [24]. Нами была получена культура КФЭК с наибольшей эффективностью при заборе периферической крови во время или сразу после введения катетера при чрескожном коронарном вмешательстве, в сравнении со стандартным забором крови у пациентов с ИБС. Предположительно эффективность получения объясняется механическим повреждением сосудистой стенки и ишемией, вызванной данной процедурой. Источником, вероятно, являются резидентные эндотелиальные прогениторные клетки из прилегающей сосудистой стенки, что подтверждается фенотипом полученной культуры CD31+vWF+CD144+CD146+CD34+/-CD133-CD45-.

В данном исследовании проведена всесторонняя валидация колониеформирующих эндотелиальных клеток на предмет соответствия эндотелиальным клеткам. Выявлено, что КФЭК в зависимости от условий могут быть дифференцированы в артериальный, венозный или лимфатический эндотелий. Интересно, что КФЭК характеризовались более высокой экспрессией гена венозного эндотелиального маркера NRP2 в сравнении с НСАЕС и более высокой экспрессией гена маркера артериальной дифференцировки NOTCH4 в сравнении с HUVEC. Сочетание результатов анализа протеомного профиля ангиогенных молекул методом дот-блоттинга и преимущественно промежуточный уровень маркеров эндотелиальной спецификации и эндотелиально-мезенхимального перехода больше свидетельствуют о промежуточной спецификации КФЭК (между ар-

териальными и венозными эндотелиальными клетками). Можно предположить, что обнаруженная нами гиперэкспрессия у КФЭК генов, кодирующих белки ВКМ, в частности белки базальной мембраны, могут свидетельствовать об усиленном синтезе ВКМ и, как следствие способствовать формированию устойчивой адгезии ЭК, формированию неоинтимы и способствовать эффективной репарации. Гены COL1A1 и COL1A2 кодируют $\alpha 1$ и $\alpha 2$ цепи коллагена I типа, который принадлежит к семейству фибриллярного коллагена и является главным компонентом ВКМ. В свою очередь гены COL4A1 и COL4A2 кодируют $\alpha 1$ и $\alpha 2$ цепи коллагена IV типа, который является основным структурным компонентом базальных мембран и взаимодействует с другими компонентами ВКМ, такими как перлеканы, протеогликаны и ламинины. Коллаген IV типа, посредством взаимодействия с интегринами, индуцирует внутриклеточную передачу сигналов, тем самым способствуя пролиферации эндотелиальных клеток и ингибируя апоптоз [38].

Можно говорить о согласованности данных RNA-seq и протеомного профилирования в отношении переходной эндотелиальной спецификации КФЭК, полученных из мононуклеарных клеток периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца. Мануаль-

ное аннотирование ДЭГ показало, что КФЭК сверхэкспрессируют маркеры всех трех спецификаций эндотелиальной дифференцировки (KDR, VWF, CD34, NRP2, FLT4 и LYVE1 по сравнению с HCAEC; NOTCH4, DLL2, и LYVE1 по сравнению с HUVEC).

В целом неоднородность между артериальной и венозной спецификацией эндотелиальных клеток (на уровне транскрипции ниже, чем гетерогенность микрососудистых эндотелиальных клеток в тканях), вероятно, в значительной степени может быть обусловлена органоспецифичностью микроокружения [39, 40].

Заключение

Полученная культура КФЭК характеризуется стабильным эндотелиальным фенотипом, сохранностью ангиогенных свойств, а также характеризуется промежуточной спецификацией между артериальными и венозными эндотелиальными клетками. Таким образом, уникальные свойства КФЭК и возможность их получения из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца делает КФЭК ценным кандидатом для использования в регенеративной медицине, в том числе при создании персонифицированных клеточнозаселенных сосудистых протезов.

Литература:

1. Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A., Loscalzo J., Zimmerman G.A., McEver R.P., Pober J.S., Wick T.M., Konkle B.A., Schwartz B.S., Barnathan E.S., McCrae K.R., Hug B.A., Schmidt A.M., Stern D.M. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998;91(10):3527-3561.
2. Niklason L.E., Lawson J.H. Bioengineered human blood vessels. *Science*. 2020;370(6513):eaaw8682. <https://doi.org/10.1126/science.aaw8682>
3. Ardila D.C., Liou J.J., Maestas D., Slepian M.J., Badowski M., Wagner W.R., Harris D., Vande Geest J.P. Surface Modification of Electrospun Scaffolds for Endothelialization of Tissue-Engineered Vascular Grafts Using Human Cord Blood-Derived Endothelial Cells. *J. Clin. Med.* 2019;8(2):185. <https://doi.org/10.3390/jcm8020185>
4. Yoder M.C. Human endothelial progenitor cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012;2(7):a006692. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006692>
5. Keighron C., Lyons C.J., Creane M., O'Brien T., Liew A. Recent Advances in Endothelial Progenitor Cells Toward Their Use in Clinical Translation. *Front. Med. (Lausanne)*. 2018;5:354. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00354>
6. Medina R.J., O'Neill C.L., Sweeney M., Guduric-Fuchs J., Gardiner T.A., Simpson D.A., Stitt A.W. Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities. *BMC Med. Genomics*. 2010;3:18. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-3-18>
7. Banno K., Yoder M.C. Tissue regeneration using endothelial colony-forming cells: promising cells for vascular repair. *Pediatr. Res.* 2018;83(1-2):283-290. <https://doi.org/10.1038/pr.2017.231>
8. Tan W., Boodagh P., Selvakumar P.P., Keyser S. Strategies to counteract adverse remodeling of vascular graft: A 3D view of current graft innovations. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2023;10:1097334. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1097334>
9. Yoon C.H., Hur J., Park K.W., Kim J.H., Lee C.S., Oh I.Y., Kim T.Y., Cho H.J., Kang H.J., Chae I.H., Yang H.K., Oh B.H., Park Y.B., Kim H.S. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation*. 2005;112(11):1618-1627. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.503433>
10. Medina R.J., Barber C.L., Sabatier F., Dignat-George F., Melero-Martin J.M., Khosrotehrani K., Ohneda O., Randi A.M., Chan J.K.Y., Yamaguchi T., Van Hinsbergh V.W.M., Yoder M.C., Stitt A.W. Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature. *Stem Cells Transl. Med.* 2017;6(5):1316-1320. <https://doi.org/10.1002/sctm.16-0360>
11. Medina R.J., O'Neill C.L., O'Doherty T.M., Knott H., Guduric-Fuchs J., Gardiner T.A., Stitt A.W. Myeloid angiogenic cells act as alternative M2 macrophages and modulate angiogenesis through interleukin-8. *Mol. Med.* 2011;17(9-10):1045-1055. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00129>
12. Gifre-Renom L., Daems M., Luttun A., Jones E.A.V. Organ-Specific Endothelial Cell Differentiation and Impact of Micro-environmental Cues on Endothelial Heterogeneity. *Int. J. Mol. Sci.*

- 2022;23(3):1477. <https://doi.org/10.3390/ijms23031477>
13. 13 Paik D.T., Tian L., Williams I.M., Rhee S., Zhang H., Liu C., Mishra R., Wu S.M., Red-Horse K., Wu J.C. Single-Cell RNA Sequencing Unveils Unique Transcriptomic Signatures of Organ-Specific Endothelial Cells. *Circulation*. 2020;142(19):1848-1862. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041433>
14. 14. Aird W.C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ. Res.* 2007;100(2):158-173. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a>
15. 15. Koenig A.L., Shchukina I., Amrute J., Andhey P.S., Zaitsev K., Lai L., Bajpai G., Bredemeyer A., Smith G., Jones C., Terrebonne E., Rentschler S.L., Artyomov M.N., Lavine K.J. Single-cell transcriptomics reveals cell-type-specific diversification in human heart failure. *Nat. Cardiovasc. Res.* 2022;1(3):263-280. <https://doi.org/10.1038/s44161-022-00028-6>
16. 16. Abdelgawad M.E., Desterke C., Uzan G., Naserian S. Single-cell transcriptomic profiling and characterization of endothelial progenitor cells: new approach for finding novel markers. *Stem Cell Res. Ther.* 2021;12(1):145. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02185-0>
17. 17. Steinle J.J., Meininger C.J., Forough R., Wu G., Wu M.H., Granger H.J. Eph B4 receptor signaling mediates endothelial cell migration and proliferation via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 2002;277(46):43830-43835. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207221200>
18. 18. Zhang H.F., Wang Y.L., Tan Y.Z., Wang H.J., Tao P., Zhou P. Enhancement of cardiac lymphangiogenesis by transplantation of CD34+VEGFR-3+ endothelial progenitor cells and sustained release of VEGF-C. *Basic Res. Cardiol.* 2019;114(6):43. <https://doi.org/10.1007/s00395-019-0752-z>
19. 19. Smadja D.M., Bièche I., Silvestre J.S., Germain S., Cornet A., Laurendeau I., Duong-Van-Huyen J.P., Emmerich J., Vidaud M., Aiach M., Gaussem P. Bone morphogenetic proteins 2 and 4 are selectively expressed by late outgrowth endothelial progenitor cells and promote neoangiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008;28
20. 20. Obi S., Yamamoto K., Shimizu N., Kumagaya S., Masumura T., Sokabe T., Asahara T., Ando J. Fluid shear stress induces arterial differentiation of endothelial progenitor cells. *J. Appl. Physiol.* (1985). 2009;106(1):203-211. <https://doi.org/10.1152/japphysiol.00197.2008>
21. 21. Muto A., Model L., Ziegler K., Eghbalieh S.D., Dardik A. Mechanisms of vein graft adaptation to the arterial circulation: insights into the neointimal algorithm and management strategies. *Circ. J.* 2010;74(8):1501-1512. <https://doi.org/10.1253/circ.aj.10-0495>
22. 22. Owens C.D., Gasper W.J., Rahman A.S., Conte M.S. Vein graft failure. *J. Vasc. Surg.* 2015;61(1):203-216. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2013.08.019>
23. 23. Cai Q., Liao W., Xue F., Wang X., Zhou W., Li Y., Zeng W. Selection of different endothelialization modes and different seed cells for tissue-engineered vascular graft. *Bioact. Mater.* 2021;6(8):2557-2568. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.12.021>
24. 24. Matveeva V., Khanova M., Sardin E., Antonova L., Barbarash O. Endovascular Interventions Permit Isolation of Endothelial Colony-Forming Cells from Peripheral Blood. *Int J Mol Sci.* 2018; 19 (11): 3453. <https://doi.org/10.3390/ijms19113453>.
25. 25. Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Ханова М.Ю., Антонова Л.В. Влияние напряжения сдвига на свойства колониеформирующих эндотелиальных клеток в сравнении с эндотелиальными клетками коронарных артерий. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2022;11(4):90-97. <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2022-11-4-90-97>
26. 26. Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G., Minick C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 1973;52(11):2745-2756. <https://doi.org/10.1172/JCI107470>
27. 27. Ucuzian A.A., Greisler H.P. In vitro models of angiogenesis. *World J Surg.* 2007; 31 (4): 654-63. <https://doi.org/10.1007/s00268-006-0763-4>.
28. 28. Inoue M., Itoh H., Ueda M., Naruko T., Kojima A., Komatsu R., Doi K., Ogawa Y., Tamura N., Takaya K., Igaki T., Yamashita J., Chun T.H., Masatsugu K., Becker A.E., Nakao K. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation*. 1998; 98 (20): 2108-16. <https://doi.org/10.1161/01.cir.98.20.2108>.
29. 29. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int.* 1999; 56 (3): 794-814. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00610.x>.
30. 30. Fong G.H., Rossant J., Gertsenstein M., Breitman M.L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995; 376 (6535): 66-70. <https://doi.org/10.1038/376066a0>.
31. 31. Nishi J., Minamino T., Miyauchi H., Nojima A., Tateno K., Okada S., Orimo M., Moriya J., Fong G.H., Sunagawa K., Shibuya M., Komuro I. Vascular endothelial growth factor receptor-1 regulates postnatal angiogenesis through inhibition of the excessive activation of Akt. *Circ Res.* 2008; 103 (3): 261-8. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.174128>.
32. 32. Veikkola T., Jussila L., Makinen T., Karpanen T., Jeltsch M., Petrova T.V., Kubo H., Thurston G., McDonald D.M., Achen M.G., Stacker S.A., Alitalo K. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 2001; 20 (6): 1223-1231. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.6.1223>
33. 33. Dallinga M.G., Habani Y.I., Schimmel A.W.M., Dallinga-Thie G.M., van Noorden C.J.F., Klaassen I., Schlingemann R.O. The Role of Heparan Sulfate and Neuropilin 2 in VEGFA Signaling in Human Endothelial Tip Cells and Non-Tip Cells during Angiogenesis In Vitro. *Cells*. 2021;10 (4): 926. <https://doi.org/10.3390/cells10040926>.
34. 34. Evans I.M., Yamaji M., Britton G., Pellet-Many C., Lockie C., Zachary I.C., Frankel P. Neuropilin-1 signaling through p130Cas tyrosine phosphorylation is essential for growth factor-dependent migration of glioma and endothelial cells. *Mol Cell Biol.* 2011; 31 (6): 1174-85. <https://doi.org/10.1128/MCB.00903-10>.
35. 35. Brüttsch R., Liebler S.S., Wüsthube J., Bartol A., Herberich S.E., Adam M.G., Telzerow A., Augustin H.G., Fischer A. Integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 attenuates sprouting angiogenesis. *Circ Res.* 2010; 107 (5): 592-601. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.217257>.
36. 36. Wang Y., Yang C., Gu Q., Sims M., Gu W., Pfeffer L.M., Yue J. KLF4 Promotes Angiogenesis by Activating VEGF Signaling in Human Retinal Microvascular Endothelial Cells. *PLoS One*. 2015; 10 (6): e0130341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130341>.
37. 37. Rezzola S., Di Somma M., Corsini M., Leali D., Ravelli C., Polli V.A.B., Grillo E., Presta M., Mitola S. VEGFR2 activation mediates the pro-angiogenic activity of BMP4. *Angiogenesis*. 2019; 22 (4): 521-533. <https://doi.org/10.1007/s10456-019-09676-y>.
38. 38. Wang H., Su Y. Collagen IV contributes to nitric oxide-induced angiogenesis of lung endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011; 300 (5): C979-88. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00368.2010>.
39. 39. Kalucka J., de Rooij L.P.M.H., Goveia J., Rohlenova K., Damas S.J., Meta E., Conchinha N.V., Taverna F., Teuwen L.A., Veys K., García-Caballero M., Khan S., Geldhof V., Sokol L., Chen R., Treps L., Borri M., de Zeeuw P., Dubois C., Karakach T.K., Falkenberg K.D., Parys M., Yin X., Vinkier S., Du Y., Fenton R.A., Schoonjans L., Dewerchin M., Eelen G., Thienpont B., Lin L., Bolund L., Li X., Luo Y., Carmeliet P. Single-Cell Transcriptome Atlas of Murine Endothelial Cells. *Cell*. 2020;180(4):764-779.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.015>.
40. 40. Brulois K., Rajaraman A., Szade A., Nordling S., Bogoslowski A., Dermadi D., Rahman M., Kiehl H., O'Hara E., Koning J.J., Kawashima H., Zhou B., Vestweber D., Red-Horse K., Mebius R.E., Adams R.H., Kubes P., Pan J., Butcher E.C. A molecular map of murine lymph node blood vascular endothelium at single cell resolution. *Nat. Commun.* 2020;11(1):3798. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17291-5>

References:

1. Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A., Loscalzo J., Zimmerman G.A., McEver R.P., Pober J.S., Wick T.M., Konkle B.A., Schwartz B.S., Barnathan E.S., McCrae K.R., Hug B.A., Schmidt A.M., Stern D.M. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998;91(10):3527-3561.
2. Niklason L.E., Lawson J.H. Bioengineered human blood vessels. *Science*. 2020;370(6513):eaaw8682. <https://doi.org/10.1126/science.aaw8682>
3. Ardila D.C., Liou J.J., Maestas D., Slepian M.J., Badowski M., Wagner W.R., Harris D., Vande Geest J.P. Surface Modification of Electrospun Scaffolds for Endothelialization of Tissue-Engineered Vascular Grafts Using Human Cord Blood-Derived Endothelial Cells. *J. Clin. Med.* 2019;8(2):185. <https://doi.org/10.3390/jcm8020185>
4. Yoder M.C. Human endothelial progenitor cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012;2(7):a006692. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006692>
5. Keighron C., Lyons C.J., Creane M., O'Brien T., Liew A. Recent Advances in Endothelial Progenitor Cells Toward Their Use in Clinical Translation. *Front. Med. (Lausanne)*. 2018;5:354. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00354>
6. Medina R.J., O'Neill C.L., Sweeney M., Guduric-Fuchs J., Gardiner T.A., Simpson D.A., Stitt A.W. Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities. *BMC Med. Genomics*. 2010;3:18. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-3-18>
7. Banno K., Yoder M.C. Tissue regeneration using endothelial colony-forming cells: promising cells for vascular repair. *Pediatr. Res.* 2018;83(1-2):283-290. <https://doi.org/10.1038/pr.2017.231>
8. Tan W., Boodagh P., Selvakumar P.P., Keyser S. Strategies to counteract adverse remodeling of vascular graft: A 3D view of current graft innovations. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2023;10:1097334. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1097334>
9. Yoon C.H., Hur J., Park K.W., Kim J.H., Lee C.S., Oh I.Y., Kim T.Y., Cho H.J., Kang H.J., Chae I.H., Yang H.K., Oh B.H., Park Y.B., Kim H.S. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation*. 2005;112(11):1618-1627. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.503433>
10. Medina R.J., Barber C.L., Sabatier F., Dignat-George F., Melero-Martin J.M., Khosrotehrani K., Ohneda O., Randi A.M., Chan J.K.Y., Yamaguchi T., Van Hinsbergh V.W.M., Yoder M.C., Stitt A.W. Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature. *Stem Cells Transl. Med.* 2017;6(5):1316-1320. <https://doi.org/10.1002/scrm.16-0360>
11. Medina R.J., O'Neill C.L., O'Doherty T.M., Knott H., Guduric-Fuchs J., Gardiner T.A., Stitt A.W. Myeloid angiogenic cells act as alternative M2 macrophages and modulate angiogenesis through interleukin-8. *Mol. Med.* 2011;17(9-10):1045-1055. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00129>
12. Gifre-Renom L., Daems M., Luttun A., Jones E.A.V. Organ-Specific Endothelial Cell Differentiation and Impact of Microenvironmental Cues on Endothelial Heterogeneity. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(3):1477. <https://doi.org/10.3390/ijms23031477>
13. Paik D.T., Tian L., Williams I.M., Rhee S., Zhang H., Liu C., Mishra R., Wu S.M., Red-Horse K., Wu J.C. Single-Cell RNA Sequencing Unveils Unique Transcriptomic Signatures of Organ-Specific Endothelial Cells. *Circulation*. 2020;142(19):1848-1862. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041433>
14. Aird W.C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ. Res.* 2007;100(2):158-173. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a>
15. Koenig A.L., Shchukina I., Amrute J., Andhey P.S., Zaitsev K., Lai L., Bajpai G., Bredemeyer A., Smith G., Jones C., Terrebbonne E., Rentschler S.L., Artyomov M.N., Lavine K.J. Single-cell transcriptomics reveals cell-type-specific diversification in human heart failure. *Nat. Cardiovasc. Res.* 2022;1(3):263-280. <https://doi.org/10.1038/s44161-022-00028-6>
16. Abdelgawad M.E., Desterke C., Uzan G., Naserian S. Single-cell transcriptomic profiling and characterization of endothelial progenitor cells: new approach for finding novel markers. *Stem Cell Res. Ther.* 2021;12(1):145. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02185-0>
17. Steinle J.J., Meininger C.J., Forough R., Wu G., Wu M.H., Granger H.J. Eph B4 receptor signaling mediates endothelial cell migration and proliferation via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 2002;277(46):43830-43835. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207221200>
18. Zhang H.F., Wang Y.L., Tan Y.Z., Wang H.J., Tao P., Zhou P. Enhancement of cardiac lymphangiogenesis by transplantation of CD34+VEGFR-3+ endothelial progenitor cells and sustained release of VEGF-C. *Basic Res. Cardiol.* 2019;114(6):43. <https://doi.org/10.1007/s00395-019-0752-z>
19. Smadja D.M., Bièche I., Silvestre J.S., Germain S., Cornet A., Laurendeau I., Duong-Van-Huyen J.P., Emmerich J., Vidaud M., Aiach M., Gaussem P. Bone morphogenetic proteins 2 and 4 are selectively expressed by late outgrowth endothelial progenitor cells and promote neoangiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008;28
20. Obi S., Yamamoto K., Shimizu N., Kumagaya S., Masumura T., Sokabe T., Asahara T., Ando J. Fluid shear stress induces arterial differentiation of endothelial progenitor cells. *J. Appl. Physiol.* (1985). 2009;106(1):203-211. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00197.2008>
21. Muto A., Model L., Ziegler K., Eghbali S.D., Dardik A. Mechanisms of vein graft adaptation to the arterial circulation: insights into the neointimal algorithm and management strategies. *Circ. J.* 2010;74(8):1501-1512. <https://doi.org/10.1253/circj.cj-10-0495>
22. Owens C.D., Gasper W.J., Rahman A.S., Conte M.S. Vein graft failure. *J. Vasc. Surg.* 2015;61(1):203-216. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2013.08.019>
23. Cai Q., Liao W., Xue F., Wang X., Zhou W., Li Y., Zeng W. Selection of different endothelialization modes and different seed cells for tissue-engineered vascular graft. *Bioact. Mater.* 2021;6(8):2557-2568. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.12.021>
24. Matveeva V., Khanova M., Sardin E., Antonova L., Barbarash O. Endovascular Interventions Permit Isolation of Endothelial Colony-Forming Cells from Peripheral Blood. *Int J Mol Sci.* 2018; 19 (11): 3453. <https://doi.org/10.3390/ijms19113453>
25. Velikanova E.A., Matveeva V.G., Khanova M.Yu., Antonova L.V. Effects of shear stress on the properties of colonyforming endothelial cells in comparison with coronary artery endothelial cells. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2022;11(4):90-97. (In Russ.) <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2022-11-4-90-97>
26. Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G., Minick C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 1973;52(11):2745-2756. <https://doi.org/10.1172/JCI107470>
27. Ucuzian A.A., Greisler H.P. In vitro models of angiogenesis. *World J Surg.* 2007; 31 (4): 654-63. <https://doi.org/10.1007/s00268-006-0763-4>
28. Inoue M., Itoh H., Ueda M., Naruko T., Kojima A., Komatsu R., Doi K., Ogawa Y., Tamura N., Takaya K., Igaki T., Yamashita J., Chun T.H., Masatsugu K., Becker A.E., Nakao K. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation*. 1998; 98 (20): 2108-16. <https://doi.org/10.1161/01.cir.98.20.2108>
29. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int.* 1999; 56 (3): 794-814. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00610.x>
30. Fong G.H., Rossant J., Gertsenstein M., Breitman M.L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995; 376 (6535): 66-70. <https://doi.org/10.1038/376066a0>
31. Nishi J., Minamino T., Miyauchi H., Nojima A., Tateno K., Okada S., Orimo M., Moriya J., Fong G.H., Sunagawa K., Shibuya M., Komuro I. Vascular endothelial growth factor receptor-1 regulates postnatal angiogenesis through inhibition of the excessive activation of Akt. *Circ Res.* 2008; 103 (3): 261-8. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.174128>
32. Veikkola T., Jussila L., Makinen T., Karpanen T., Jeltsch M., Petrova T.V., Kubo H., Thurston G., McDonald D.M., Achen M.G., Stacker S.A., Alitalo K. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 2001; 20 (6): 1223-1231. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.6.1223>
33. Dallinga M.G., Habani Y.I., Schimmel A.W.M., Dallinga-Thie G.M., van Noorden C.J.F., Klaassen I., Schlingemann R.O. The Role of Heparan Sulfate and Neuropilin 2 in VEGFA Signaling in Human Endothelial Tip Cells and Non-Tip Cells during Angiogenesis In Vitro. *Cells*. 2021;10 (4): 926. <https://doi.org/10.3390/cells10040926>
34. Evans I.M., Yamaji M., Britton G., Pellet-Many C., Lockie C., Zachary I.C., Frankel P. Neuropilin-1 signaling through p130Cas tyrosine phosphorylation is essential for growth factor-dependent migration of glioma and endothelial cells. *Mol Cell Biol.* 2011; 31 (6): 1174-85. <https://doi.org/10.1128/MCB.00903-10>
35. Brüttsch R., Liebler S.S., Wüsthube J., Bartol A., Herberich S.E., Adam M.G., Telzerow A., Augustin H.G., Fischer A. Integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 attenuates sprouting angiogenesis.

- Circ Res. 2010; 107 (5): 592-601. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESA-HA.110.217257>.
36. Wang Y., Yang C., Gu Q., Sims M., Gu W., Pfeffer L.M., Yue J. KLF4 Promotes Angiogenesis by Activating VEGF Signaling in Human Retinal Microvascular Endothelial Cells. *PLoS One*. 2015; 10 (6): e0130341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130341>.
37. Rezzola S., Di Somma M., Corsini M., Leali D., Ravelli C., Polli V.A.B., Grillo E., Presta M., Mitola S. VEGFR2 activation mediates the pro-angiogenic activity of BMP4. *Angiogenesis*. 2019; 22 (4): 521-533. <https://doi.org/10.1007/s10456-019-09676-y>.
38. Wang H., Su Y., Collagen IV contributes to nitric oxide-induced angiogenesis of lung endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011; 300 (5): C979-88. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00368.2010>.
39. Kalucka J., de Rooij L.P.M.H., Goveia J., Rohlenova K., Dumas S.J., Meta E., Conchinha N.V., Taverna F., Teuwen L.A., Veys K., García-Caballero M., Khan S., Geldhof V., Sokol L., Chen R., Treps L., Borri M., de Zeeuw P., Dubois C., Karakach T.K., Falkenberg K.D., Parys M., Yin X., Vinckier S., Du Y., Fenton R.A., Schoonjans L., Dewerchin M., Eelen G., Thienpont B., Lin L., Bolund L., Li X., Luo Y., Carmeliet P. Single-Cell Transcriptome Atlas of Murine Endothelial Cells. *Cell*. 2020;180(4):764-779.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.015>.
40. Brulois K., Rajaraman A., Szade A., Nordling S., Bogoslawski A., Dermadi D., Rahman M., Kiefel H., O'Hara E., Koning J.J., Kawashima H., Zhou B., Vestweber D., Red-Horse K., Mebius R.E., Adams R.H., Kubes P., Pan J., Butcher E.C. A molecular map of murine lymph node blood vascular endothelium at single cell resolution. *Nat. Commun*. 2020;11(1):3798. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17291-5>

Сведения об авторах

Ханова Марьям Юрисовна, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6).

Вклад в статью: анализ и интерпретация данных исследования, написание статьи.

ORCID: 0000-0002-8826-9244

Кутихин Антон Геннадьевич, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией молекулярной, трансляционной и цифровой медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6).

Вклад в статью: анализ и интерпретация данных исследования, написание соответствующего раздела статьи, утверждение окончательной версии для публикации.

ORCID: 0000-0001-8679-4857

Матвеева Вера Геннадьевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6).

Вклад в статью: разработка экспериментального дизайна, выполнение клеточного эксперимента.

ORCID: 0000-0002-4146-3373

Великанова Елена Анатольевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6).

Вклад в статью: выполнение клеточного эксперимента, анализ и интерпретация данных исследования, описание соответствующего раздела статьи.

ORCID: 0000-0002-1079-1956

Кривкина Евгения Олеговна, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6).

Вклад в статью: выполнение клеточного эксперимента, описание соответствующего раздела статьи.

ORCID: 0000-0002-2500-2147

Антонова Лариса Валерьевна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией клеточных технологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6).

Вклад в статью: существенный вклад в дизайн исследования, утверждение окончательной версии для публикации

ORCID: 0000-0002-8874-0788

Authors

Mrs. Mariam Yu. Khanova, Junior Researcher, Laboratory of cells technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation).

Contribution: data collection and interpretation, manuscript writing.

ORCID: 0000-0002-8826-9244

Prof. Anton G. Kutikhin, MD, DSc, Head of Laboratory for Molecular, Translational and Digital Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation).

Contribution: data collection and interpretation, writing of the relevant section of the article, approval of the final version for publication.

ORCID: 0000-0001-8679-4857

Dr. Vera G. Matveeva, MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory of cells technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation).

Contribution: development of experimental design, performed the cell culture experiment.

ORCID: 0000-0002-4146-3373

Mrs. Elena A. Velikanova, PhD (biology), Researcher, Laboratory of cells technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation).

Contribution: performed the cell culture experiment, data collection and interpretation, writing of the relevant section of the article.

ORCID: 0000-0002-1079-1956

Mrs. Evgeniya O. Krivkina, Junior Researcher, Laboratory of cells technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation).

Contribution: performed the cell culture experiment, writing of the relevant section of the article.

ORCID: 0000-0002-2500-2147

Prof. Larisa V. Antonova, MD, DSc, Head of Lab of cells technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases (6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation).

Contribution: significant contribution to study design, approval of the final version for publication.

ORCID: 0000-0002-8874-0788

Статья поступила: 19.07.2023г.

Принята в печать: 30.11.2023г.

Контент доступен под лицензией
CC BY 4.0.

Received: 19.07.2023

Accepted: 30.11.2023

Creative Commons Attribution
CC BY 4.0.