



УДК 57.085.23

DOI 10.17802/2306-1278-2022-11-3-97-114

СЛУЧАЙ СПОНТАННОГО ЭНДОТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА В КУЛЬТУРЕ ПЕРВИЧНЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПУПОЧНОЙ ВЕНЫ ЧЕЛОВЕКА

Д.К. Шишкова, А.В. Синицкая, М.Ю. Синицкий, В.Г. Матвеева, Е.А. Великанова,
В.Е. Маркова, А.Г. Кутихин

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Сосновский бульвар, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Основные положения

• Спонтанный эндотелиально-мезенхимальный переход первичных эндотелиальных клеток пупочной вены человека характеризуется многократным повышением уровня экспрессии генов транскрипционных факторов *SNAI2* и *TWIST1*, полной потерей экспрессии маркеров и транскрипционных факторов эндотелиальной дифференцировки (*CD31/PECAM1*, *VE-кадгерина*, транскрипционного фактора *ERG*), ярко выраженной экспрессией генов маркеров мезенхимальной дифференцировки (фибробласт-специфичного белка и альфа-актина гладких мышц) и выраженным синтезом основного компонента внеклеточного матрикса коллагена I типа. Оптимальным алгоритмом определения эндотелиально-мезенхимального перехода является определение транскрипции генов эндотелиальной дифференцировки (*PECAM1*, *CDH5*, *VWF*, *ERG*), генов транскрипционных факторов *SNAI2* и *TWIST1*, генов мезенхимальной дифференцировки (*FAP*, *S100A4*, *ACTA2*) и генов маркеров активности синтеза компонентов внеклеточного матрикса (*COL1A1*, *COL1A2*) с последующей верификацией отрицательной экспрессии маркеров эндотелиального фенотипа и положительной экспрессии коллагена I типа внутри клеток посредством иммунофлюоресцентного окрашивания.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель

На основании случая спонтанного эндотелиально-мезенхимального перехода разработать алгоритм и предложить инструменты для его детекции *in vitro*.

Материалы и методы

В эксперимент включены две серии первичных эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC): первая серия – классический эндотелиальный морфотип, вторая – спонтанно подвергшиеся эндотелиально-мезенхимальному переходу. В качестве отрицательного контроля (клетки с эндотелиальным морфотипом) также использованы первичные эндотелиальные клетки коронарной артерии человека (HCAEC) и первичные эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии человека (HITAEC). Оценку молекулярного профиля клеток проводили методами количественной полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции, иммуноблоттинга и иммунофлюоресцентного окрашивания с последующей конфокальной микроскопией.

Результаты

В отличие от HUVEC с физиологическим профилем молекулярной экспрессии, а также артериальных эндотелиальных клеток HUVEC в состоянии эндотелиально-мезенхимального перехода характеризовались потерей экспрессии генов маркеров и транскрипционных факторов эндотелиальной дифференцировки (*PECAM1*, *CDH5*, *VWF*, *ERG*), многократно повышенной экспрессией генов двух транскрипционных факторов перехода (*SNAI2*, *TWIST1*), приобретением экспрессии генов маркеров клеток мезенхимального ряда (*FAP*, *S100A4*, *ACTA2*) и генов маркеров активности синтеза компонентов внеклеточного матрикса (*COL1A1*, *COL1A2*) при сохраненной экспрессии генов общесосудистых маркеров (*HES1*, *NRP1*). Отсутствие экспрессии генов специфичных сократительных маркеров (тяжелой цепи миозина гладких мышц (*MYH11*) и смузелина (*SMTN*)) в сочетании с приобретенной экспрессией гена менее специфичного сократительного маркера альфа-актина гладких мышц (*ACTA2*) свидетельствовало о фенотипической схожести

Для корреспонденции: Виктория Евгеньевна Маркова, marvika97@gmail.com; адрес: Сосновский бульвар, 6, Кемерово, Россия, 650002

Corresponding author: Victoria E. Markova, marvika97@gmail.com; address: 6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, Russia, 650002

	трансформированных клеток с миофибробластами, а не с сосудистыми гладкомышечными клетками сократительного фенотипа. Анализ белковой экспрессии методом иммуноблоттинга подтвердил потерю экспрессии эндотелиальных маркеров (CD31/PECAM1, VE-кадгерин/CDH5, ERG) и продемонстрировал сохранность экспрессии вышеуказанных общесосудистых маркеров. Отсутствие иммунофлюоресцентного свечения эндотелиальных маркеров (CD31/PECAM-1, VE-кадгерина, транскрипционного фактора ERG) в сочетании с интенсивным внутриклеточным свечением основного синтезируемого белка межклеточного матрикса – коллагена I типа – также подтвердило реализацию транскрипционной программы эндотелиально-мезенхимального перехода.
Закключение	Алгоритм оценки эндотелиально-мезенхимального перехода подразумевает измерение экспрессии генов <i>PECAM1</i>, <i>CDH5</i>, <i>VWF</i>, <i>ERG</i>, <i>SNAI2</i>, <i>TWIST1</i>, <i>FAP</i>, <i>S100A4</i>, <i>ACTA2</i>, <i>COL1A1</i> и <i>COL1A2</i>, комбинированное с иммунофлюоресцентным окрашиванием на CD31/PECAM-1, VE-кадгерин и транскрипционный фактор ERG в сочетании с окрашиванием на коллаген I типа.
Ключевые слова	Эндотелиально-мезенхимальный переход • Эндотелиальная дифференцировка • Мезенхимальная дифференцировка • HUVEC • Сосудистые гладкомышечные клетки • Миофибробласты

Поступила в редакцию: 05.07.2022; поступила после доработки: 31.07.2022; принята к печати: 14.08.2022

SPONTANEOUS ENDOTHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION IN HUMAN PRIMARY UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS

D.K. Shishkova, A.V. Sinitskaya, M.Yu. Sinitsky, V.G. Matveeva, E.A. Velikanova, V.E. Markova, A.G. Kutikhin

Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, 6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

Highlights

- Spontaneous endothelial-to-mesenchymal transition of primary human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) is characterized by an acquired expression of *SNAI2* and *TWIST1* genes, loss of endothelial markers and transcription factors (CD31/PECAM1, VE-cadherin, and ERG transcription factor), pronounced expression of *S100A4* and *ACTA2* genes, and active production of type I collagen, a major component of the extracellular matrix.

An optimal algorithm to detect endothelial-to-mesenchymal transition includes gene expression profiling of endothelial lineage markers (*PECAM1*, *CDH5*, *VWF*, *ERG*), *SNAI2* and *TWIST1* transcription factors, mesenchymal specification markers (*FAP*, *S100A4*, *ACTA2*) and markers of extracellular matrix synthesis (*COL1A1*, *COL1A2*) along with the subsequent negative staining for CD31/PECAM1, VE-cadherin, or ERG and positive staining for intracellular type I collagen.

Aim	To develop an algorithm and tools to determine endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) <i>in vitro</i>.
Methods	We examined two batches of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) where the first cell batch had a conventional endothelial morphology and the second cell batch underwent a spontaneous EndoMT. Human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) were used as the negative control for EndoMT. Molecular profile was assessed by means of reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction, Western blotting, and immunofluorescence staining with the further confocal microscopy.
Results	In contrast to HUVEC with the physiological profile and arterial ECs, HUVEC undergoing EndoMT lost the expression of endothelial lineage markers (<i>PECAM1</i>, <i>CDH5</i>, <i>VWF</i>, <i>ERG</i>) and acquired the expression of EndoMT transcription factors (<i>SNAI2</i>, <i>TWIST1</i>), mesenchymal markers (<i>FAP</i>, <i>S100A4</i>, <i>ACTA2</i>), and extracellular matrix components (<i>COL1A1</i>, <i>COL1A2</i>) while retaining expression of the common

	vascular markers (<i>HES1</i> , <i>NRP1</i>). Western blotting analysis confirmed the loss of endothelial markers (CD31/PECAM1, VE-cadherin/CDH5, ERG) and demonstrated retained expression of abovementioned vascular markers. Negligible expression of <i>MYH11</i> and <i>SMTN</i> genes encoding specific contractile markers (smooth muscle myosin heavy chain and smoothelin) in combination with the acquired expression of <i>ACTA2</i> gene encoding less specific contractile marker alpha smooth muscle actin indicated the phenotypic identity of EndoMT-transformed HUVEC to myofibroblasts but not contractile vascular smooth muscle cells. Loss of immunofluorescence staining of endothelial markers (CD31/PECAM-1, VE-cadherin, and ERG transcription factor) and pronounced intracellular staining of type I collagen testified to the ongoing EndoMT.
Conclusion	An algorithm to assess EndoMT implies measurement of the expression of <i>PECAM1</i> , <i>CDH5</i> , <i>VWF</i> , <i>ERG</i> , <i>SNAI2</i> , <i>TWIST1</i> , <i>FAP</i> , <i>S100A4</i> , <i>ACTA2</i> , <i>COL1A1</i> , and <i>COL1A2</i> genes in combination with the respective immunofluorescence staining for CD31/PECAM-1, VE-cadherin, or ERG transcription factor and type I collagen.
Keywords	Endothelial-to-mesenchymal transition • Endothelial differentiation • Mesenchymal differentiation • HUVEC • Vascular smooth muscle cells • Myofibroblasts

Received: 05.07.2022; received in revised form: 31.07.2022; accepted: 14.08.2022

Список сокращений	
ОТ-кПЦР	— количественная полимеразная цепная реакция после обратной транскрипции
ЭК	— эндотелиальные клетки

Введение

Эндотелиально-мезенхимальный переход (endothelial-to-mesenchymal transition, endothelial-mesenchymal transition), являясь одним из наиболее изучаемых феноменов эндотелиальной биологии, с одной стороны, играет незаменимую физиологическую роль в биологии индивидуального развития, с другой – обладает несомненной патофизиологической значимостью в развитии атеросклероза, рестеноза и фиброза миокарда [1–5]. Сущность данного процесса заключается в поэтапной трансдифференцировке эндотелиальных клеток (ЭК) в мезенхимальные, что сопровождается постепенной утратой экспрессии маркеров эндотелиальной дифференцировки (CD31/PECAM1, VE-кадгерина, фактора фон Виллебранда (VWF), транскрипционного фактора ERG) и приобретением экспрессии маркеров мезенхимальной дифференцировки (фибробласт-ассоциированного белка, фибробласт-специфичного белка, альфа-актина гладких мышц), а также повышенной способностью к синтезу компонентов внеклеточного матрикса (в частности, коллагена I типа) [1–5]. Данная смена транскрипционных программ осуществляется под управлением ряда специфических транскрипционных факторов, к которым традиционно относят Snail, Slug, TWIST1, ZEB1 и GATA4 [1–5].

С целью детекции эндотелиально-мезенхимального перехода используют ряд методов молекулярной и клеточной биологии, включая количественную полимеразную цепную реакцию после обратной транскрипции (ОТ-кПЦР), иммуноблоттинг и

иммунофлюоресцентное окрашивание, которые в совокупности позволяют оценить реализацию эндотелиальной и мезенхимальной транскрипционных и трансляционной программ, а также визуализировать данные изменения [1–6]. Патоморфологическим последствием перехода служит смена продолговатой (вытянутой, удлиненной) формы, характерной для ЭК в статических условиях и при воздействии ламинарного потока, на типичную для клеток мезенхимального ряда полиморфную [1–6]. *In vitro* изменение клеточной геометрии целесообразно детектировать при помощи фазово-контрастной микроскопии или иммунофлюоресцентного окрашивания (к примеру, сочетая окрашивание вышеуказанных эндотелиальных или мезенхимальных маркеров с окрашиванием на F-актин) [7, 8], *in vivo* – посредством сканирующей электронной микроскопии в обратно-рассеянных электронах после заливки цельных тканей в эпоксидную смолу (ЕМ-BSEM) [9].

Несмотря на сотни публикаций, посвященных проблеме эндотелиально-мезенхимального перехода, в русскоязычной литературе практически отсутствуют рекомендации по методологии его детекции, следствием чего является несовершенный дизайн исследований в этом направлении в ряде открытых (научные статьи и доклады) и закрытых (проектно-сметная и отчетная документация научных коллективов) источников. Частично данная методология описана в одном из последних критических обзоров по проблеме эндотелиальной биологии [6], однако обзорная статья не позволяет описать все экспериментальные детали и их нюансы.

Цель данной работы – разработка алгоритма и анализ применимости конкретных инструментов для детекции эндотелиально-мезенхимального перехода *in vitro* на примере случая из лабораторной практики (спонтанного перехода первичных ЭК пупочной вены человека).

Материалы и методы

Для экспериментов использовали коммерческие культуры первичных ЭК пупочной вены человека (HUVEC, 200K-05f, Cell Applications, США). В качестве положительного контроля эндотелиальной дифференцировки использовали культуры первичных ЭК коронарной артерии человека (HCAEC, 300K-05a; Cell Applications) и первичных ЭК внутренней грудной артерии человека (HITAEC, 308K-05a; Cell Applications). Эксперименты на различных линиях ЭК проводили строго параллельно для повышения воспроизводимости и достоверности результатов. Согласно информации поставщика, все указанные линии первичных ЭК подвергнуты криоконсервации на втором пассаже (500,000 клеток в базальной среде Endothelial Cell Basal Medium (210-500, Cell Applications) или MesoEndo Cell Basal Medium (212K-500, Cell Applications), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки и 10% диметилсульфоксида. Для проведения экспериментов ЭК размораживали и культивировали во флаконах T-75 (90076, Techno Plastic Products, Швейцария) согласно рекомендациям производителя в среде для роста клеток Human MesoEndo Growth Medium (212–500, Cell Applications). Визуальный анализ морфологических свойств и функционального состояния клеточных культур проводили при помощи фазово-контрастной микроскопии. Пересев производили по достижении 80% конфлюэнтности, после двух пассажей ожидали заполнения культурального пластика ЭК до конфлюэнтности, отмывали клетки в ледяном фосфатно-солевом буфере (pH 7,4, 10010023, Thermo Fisher Scientific, США)

и лизировали тризолом (15596018, Thermo Fisher Scientific) для выделения РНК либо RIPA-буфером (89901, Thermo Fisher Scientific) с коктейлем ингибиторов протеаз и фосфатаз (78444, Thermo Fisher Scientific) для выделения белка в соответствии с инструкциями производителя. Для флюоресцентного окрашивания ЭК дополнительно рассеивали в 8-луночные культуральные камеры для конфокальной микроскопии (80841, Ibidi, Германия). Все эксперименты с ЭК проводили в стерильных условиях при 37 °С, поддержании атмосферы 95% воздуха: 5% CO2 и высокой влажности (MCO-18AIC, Sanyo, Япония).

Количественный анализ и контроль качества выделенной РНК проводили с использованием спектрофлуориметра Qubit 4 (Q33238, Thermo Fisher Scientific) и наборов Qubit RNA BR (Q10210, Thermo Fisher Scientific), Qubit RNA IQ (Q33222, Thermo Fisher Scientific), стандартов для калибровки Qubit RNA IQ (Q33235, Thermo Fisher Scientific) и пробирок Qubit (Q32856, Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколами производителя. Количественный анализ общего белка проводили с использованием набора BCA Protein Assay Kit (23227, Thermo Fisher Scientific) и микропланшетного спектрофотометра Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколами производителя.

Обратную транскрипцию выделенной РНК выполняли с использованием набора High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814, Thermo Fisher Scientific). Измерение генной экспрессии проводили при помощи ОТ-кПЦР с использованием самостоятельно разработанных праймеров (500 нмоль/л каждый, «Евроген», табл. 1), кДНК (20 нг) и мастер-микса PowerUp SYBR Green (A25778, Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя для Tm ≥60 °С (стандартные настройки амплификатора). Для каждой биологической повторности при измерении уровня генной

Таблица 1. Последовательности праймеров для ОТ-кПЦР

Table 1. Primer sequences for reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction

Ген / Gene	Форвард-праймер / Forward primer	Реверс-праймер / Reverse primer
Маркеры и транскрипционные факторы эндотелиальной дифференцировки / Markers and transcription factors of endothelial lineage		
PECAM1	5'-TGGCGCATGCCTGTAGTA-3'	5'-TCCGTTTCCTGGGTTCAA-3'
CDH5	5'-AAGCGTGAGTCGCAAGAATG-3'	5'-TCTCCAGGTTTTCGCCAGTG-3'
VWF	5'-CCTTGACCTCGGACCCTTATG-3'	5'-GATGCCCCGTTACACCACT-3'
ERG	5'-CCCGAGGGACATGAGAGAAGAG-3'	5'-ACGGCTTTAGTTGCCCTTGG-3'
Маркеры и транскрипционные факторы общесосудистой дифференцировки / Markers and transcription factors of vascular specification		
HES1	5'-AGATAGCTCGCGGCATTCCAAG-3'	5'-ACTTCCCCAGCACACTTGGGT-3'
HEY1	5'-GCCGACGAGACCGGATCAAT-3'	5'-GGCGTGCGCGTCAAAGTAA-3'
HEY2	5'-ACCTCCGAGAGCGACATGGA-3'	5'-CGATCCCGACGCCTTTTCTC-3'
NRP1	5'-ATTTGGAGGACAGAGACTGCAA-3'	5'-CAACAGGAGGAGGGGCTATC-3'

Маркеры и транскрипционные факторы венозно-лимфатической дифференцировки / Markers and transcription factors of venous and lymphatic commitment		
NR2F2	5'-AGAGCAAGTGGAGAAGCTCAAG-3'	5'-TACATCAGAGAGACCACAGGCA-3'
PROX1	5'-CCCGTTATCCCAGCTCCAAT-3'	5'-GTTGATGGCTTGACGTGCGTA-3'
LYVE1	5'-TGAAGGGGTAGGCACGATGG-3'	5'-GCATGACACCTGGATGGAAAGC-3'
FLT4	5'-TGTGGTCCTTTGGGGTGCTT-3'	5'-CCCTCATCCTTGTGCCGTCT-3'
NRP2	5'-CTCGGCTTTTGACAGGTGAGAAT-3'	5'-TGCTCCAGTCCACCTCGTAT-3'
Синтез монооксида азота (NO) / Nitric oxide synthesis		
NOS3	5'-GTGATGGCGAAGCGAGTGAAG-3'	5'-CCGAGCCCGAACACACAGAAC-3'
Провоспалительная активация эндотелия / Endothelial activation		
VCAM1	5'-CGTCTTGGTCAGCCCTTCCT-3'	5'-ACATTATATACTCCCGCATCCTTC-3'
ICAM1	5'-TTGGGCATAGAGACCCCGTT-3'	5'-GCACATTGCTCAGTTCATACACC-3'
SELE	5'-GCACAGCCTTGTCCAACC-3'	5'-ACCTACCAAACCCCTTCG-3'
SELP	5'-ATGGGTGGGAACCAAAAGG-3'	5'-GGCTGACGGACTCTTGATGTAT-3'
IL6	5'-GGCACTGGCAGAAAACAACC-3'	5'-GCAAGTCTCCTCATTGAATCC-3'
CXCL8	5'-CAGAGACAGCAGAGCACAC-3'	5'-AGTTCCTTAGCACTCCTTGGC-3'
CCL2	5'-TTCTGTGCCTGCTGCTCATAG-3'	5'-AGGTGACTGGGGCATTGATTG-3'
CXCL1	5'-GCTTGCCCTCAATCCTGCATCC-3'	5'-ACAATCCAGGTGGCCTCTGC-3'
MIF	5'-GGTGTCCGAGAAGTCAGGCA-3'	5'-GGGGCACGTTGGTGTTTACG-3'
Нарушения эндотелиальной механотрансдукции / Impairment of endothelial mechanotransduction		
KLF2	5'-CAGCACTGGTCTGGTTGCTTG-3'	5'-ACCCACTGCACACGATGCTT-3'
KLF4	5'-GAAAAGGACCGCCACCCACA-3'	5'-AGCGGGCGAATTTCATCCA-3'
NFE2L2	5'-GCACATCCAGTCAGAAACCAGT-3'	5'-ACTGAAACGTAGCCGAAGAAAC-3'
Развитие эндотелиально-мезенхимального перехода / Endothelial-to-mesenchymal transition		
SNAIL	5'-CAGACCCACTCAGATGTCAAGAA-3'	5'-GGGCAGGTATGGAGAGGAAGA-3'
SNAIL2	5'-ACTCCGAAGCCAAATGACAA-3'	5'-CTCTCTCTGTGGGTGTGTGT-3'
TWIST1	5'-GTCCGCAGTCTTACGAGGAG-3'	5'-GCTTGAGGGTCTGAATCTTGCT-3'
ZEB1	5'-GATGATGAATGCGAGTCAGATGC-3'	5'-ACAGCAGTGTCTTGTGTTGT-3'
Эндотелиальное звено гемостаза / Endothelial haemostasis		
SERPINE1	5'-CGCCGCCTCTTCCACAAATC-3'	5'-AGGGCAGTTCCAGGATGTCG-3'
PLAU	5'-CCTGGGTCGCTCAAGGCTTA-3'	5'-CACACCTGCCCTCCTTGGA-3'
PLAT	5'-TGGAGCAGTCTTCGTTTCGC-3'	5'-CCATGACTGATGTTGCTGGTA-3'
Маркеры клеток мезенхимального ряда / Markers of mesenchymal specification		
CDH2	5'-GCTTCTGGTGAATCGCATTA-3'	5'-AGTCTCTCTTCTGCCTTTGTAG-3'
VIM	5'-CGCCAGATGCGTGAATGG-3'	5'-ACCAGAGGGAGTGAATCCAGA-3'
FAP	5'-TCAACTGTGATGGCAAGAGCA-3'	5'-TAGGAAGTGGGTCATGTGGGT-3'
S100A4	5'-GCCCTGGATGTGATGGTGT-3'	5'-TCGTTGTCCCTGTTGCTGTC-3'
Маркеры сосудистой гладкомышечной дифференцировки / Markers of vascular smooth muscle cell lineage		
ACTA2	5'-GTGTTGCCCCCTGAAGAGCAT-3'	5'-GCTGGGACATTGAAAGTCTCA-3'
SMTN	5'-GGGATCGTGTCACAAGTTCA-3'	5'-GCTACTCCTCGTTGCTCCTT-3'
MYH11	5'-GGTCACGTTTGGGAAAGATGA-3'	5'-GGGCAGGTGTTTATAGGGGTT-3'
Компоненты внеклеточного матрикса / Extracellular matrix components		
COL1A1	5'-GTCACCCACCGACCAAGAAACC-3'	5'-AAGTCCAGGCTGTCCAGGGATG-3'
COL1A2	5'-CCCCTGGTATGACTGGTTTCCC-3'	5'-GTCACCACGAGGACCACGAA-3'
Компоненты базальной мембраны / Basement membrane components		
COL4A1	5'-GGACTACCTGGAACAAAAGGG-3'	5'-GCCAAGTATCTCACCTGGATCA-3'
COL4A2	5'-CAGGTTTTCCGGGACTCCGT-3'	5'-AAGGGTGTTGGCCTCTCCTG-3'
Гены «домашнего хозяйства» / Housekeeping genes		
ACTB	5'-CATCGAGCACGGCATCGTCA-3'	5'-TAGCACAGCCTGGACAGCAAC-3'
GAPDH	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
B2M	5'-TCCATCCGACATTGAAGTTG-3'	5'-CGGCAGGCATACTCATCTT-3'

экспрессии выполняли три технических повторности. Реакцию считали успешно проведенной при эффективности 90–105% и $R2 \geq 0,98$. Количественный анализ уровней мРНК в лизате ЭК (*PECAM1*, *CDH5*, *VWF*, *NRP1*, *ERG*, *HES1*, *HEY1*, *HEY2*, *NR2F2*, *PROX1*, *LYVE1*, *FLT4*, *NRP2*, *NOS3*, *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SELP*, *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*, *KLF2*, *KLF4*, *NFE2L2*, *SNAIL*, *SNAI2*, *TWIST1*, *ZEB1*, *SERPINE1*, *PLAU*, *PLAT*, *CDH2*, *VIM*, *FAP*, *SI00A4*, *ACTA2*, *SMTN*, *MYH11*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL4A1*, *COL4A2*) проводили посредством сравнения ΔCt . Относительные уровни транскриптов (ΔCt) пересчитывали относительно экспрессии референсных генов (*ACTB*, *GAPDH*, *B2M*).

Измерение экспрессии белковых молекул выполняли посредством иммуноблоттинга. Одинаковые количества белка (25 мкг на образец) смешивали с буфером на основе додецилсульфата лития NuPAGE (NP0007, Thermo Fisher Scientific) в соотношении 4:1 и восстановителем NuPAGE (NP0009, Thermo Fisher Scientific) в соотношении 10:1, денатурировали при 99 °C в течение 5 минут и далее загружали на 1,5 мм гель NuPAGE 4–12% Bis-Tris ((NP0335BOX, Thermo Fisher Scientific). В качестве маркера молекулярных масс использовали смесь белковых стандартов Novex Sharp Pre-Stained (LC5800, Thermo Fisher Scientific) и MagicMark XP Western в соотношении 1:1 (LC5602, Thermo Fisher Scientific). Белки разделяли путем электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) при напряжении 150 В в течение 2 ч с использованием буфера для разделения белков NuPAGE MES SDS (NP0002, Thermo Fisher Scientific), антиоксиданта NuPAGE (NP0005, Thermo Fisher Scientific) и камеры для вертикального электрофореза XCell SureLock Mini-Cell (EI0001, Thermo Fisher Scientific). Перенос белка выполняли с помощью мембран из поливинилидендифторида (PVDF) (IB24001, Thermo Fisher Scientific) и прибора для сухого переноса iBlot 2 (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя в стандартном режиме для белков с молекулярной массой 30–150 кДа (Р0 – 20 В в течение одной минуты, 23 В в течение 4 минут и 25 В в течение 2 минут). Мембраны далее инкубировали в растворе iBind Flex (SLF2020, Solution Kit Thermo Fisher Scientific) в течение часа для предотвращения неспецифического связывания.

Блоты анализировали с использованием: 1) антител кролика к маркерам эндотелиальной дифференцировки CD31 (ab182981, 1:2000, Abcam, Великобритания), VE-кадгерину (2500, 1:1000, Cell Signaling Technology, США) и NRP1 (ab81321, 1:200, Abcam), транскрипционным факторам эндотелиальной дифференцировки ERG (ab92513, 1:200, Abcam), HES1 (ab108937, 1:200, Abcam), HEY1 (ab154077, 1:200, Abcam) и HEY2 (ab221931,

1:200, Abcam), маркерам и транскрипционным факторам венозно-лимфатической дифференцировки PROX1 (ab199359, 1:200, Abcam), LYVE1 (ab14917, 1:200, Abcam), VEGFR3 (ab27278, 1:200, Abcam) и NRP2 (ab185710, 1:200, Abcam), молекулам адгезии лейкоцитов к ЭК VCAM1 (ab134047, 1:500, Abcam), ICAM1 (67836, 1:500, Abcam) и Е-селектину (ab18981, 1:100, Abcam), механочувствительным транскрипционным факторам KLF4 (ab215036, 1:200, Abcam) и NRF2 (ab62352, 1:200, Abcam), транскрипционным факторам ЭндомТ Snail и Slug (ab180714, 1:200, Abcam); 2) антител мыши к транскрипционному фактору венозно-лимфатической дифференцировки NR2F2 (ab41859, 1:200, Abcam) и транскрипционному фактору эндотелиально-мезенхимального перехода TWIST1 (sc-81417, 1:200, Santa Cruz Biotechnology, США); 3) антител козла к ядерному белку «домашнего хозяйства» YY1 (контроль загрузки, AF3784, 1:200, R&D Systems, США). Конъюгированные с пероксидазой хрена вторичные антитела козла против кролика (7074, Cell Signaling Technology), козла против мыши (AP130P, Sigma-Aldrich, США) и осла против козла (ab205723, Abcam) применяли в разведении 1:200, 1:1000 и 1:400 соответственно. Инкубирование с антителами выполняли с жидкостью iBind Flex (SLF2020, Solution Kit Thermo Fisher Scientific), карточек iBind Flex (SLF2010, Thermo Fisher Scientific) и прибора iBind Flex Western Device (SLF2000, Thermo Fisher Scientific) в течение 3 ч в соответствии с протоколами производителя. Хемилюминесцентную детекцию проводили с использованием субстрата SuperSignal West Pico PLUS (34580, Thermo Fisher Scientific) и цифрового сканера блотов C-DiGit (LI-COR Biosciences) в высокочувствительном режиме (12-минутное сканирование).

Для выполнения флуоресцентного окрашивания монослоя ЭК в 8-луночных культуральных камерах для конфокальной микроскопии (80841, Ibi) клетки фиксировали 4% параформальдегидом (P6148, Sigma-Aldrich), далее пермеабilizировали 0,1% раствором Triton X-100 (X100, Sigma-Aldrich) в течение 10 мин и производили блокировку неспецифического связывания в 1% солевом растворе бычьего сывороточного альбумина (A2153, Sigma-Aldrich) на фосфатно-солевом буфере (pH 7,4, P4417, Sigma), в течение часа. Затем клеточные культуры инкубировали с первичными антителами кролика и мыши при 4° С в течение 18 ч в сочетаниях, представленных в табл. 2. Сочетанную оценку эндотелиального и мезенхимального фенотипов проводили посредством параллельного окрашивания на: 1) CD31 (ab9498, 1:500, Abcam) и альфа-актин гладких мышц (α -SMA, ab5694, 1:250); 2) VE-кадгерин (2500, 1:250, Cell Signaling Technology) и тяжелые цепи миозина гладких мышц

(SM-MHC, ab683, 1:250, Abcam); 3) транскрипционный фактор ERG и смузелин (ab8969, 1:100, Abcam); 4) фактор фон Виллебранда (vWF, ab6994, 1:200, Abcam) и основной компонент межклеточно-го матрикса коллаген I типа (ab6308, Abcam, 1:100). Инкубацию с вторичными преадсорбированными антителами, конъюгированными с флюорофорами Alexa Fluor 488 (ab150061) и Alexa Fluor 555 (ab150110) и разведенными в соотношении 1:500, проводили в течение часа во влажном закрытом коробе при комнатной температуре. В качестве отрицательного контроля использовали вторичные антитела без окрашивания первичными антителами. Между всеми этапами, за исключением промежутка между блокировкой неспецифического связывания и инкубацией с первичными антителами, трижды выполняли промывку фосфатно-солевым буфером. Ядра контрастировали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) в течение 30 мин при комнатной температуре (10 мкг/мл, D9542, Sigma-Aldrich). Покровные стекла монтировали с помощью среды ProLong Gold Antifade (P36934, Thermo Fisher Scientific). Визуализацию срезов и анализ результатов иммунофлюоресцентного окрашивания проводили методом конфокальной микроскопии (LSM 700, Carl Zeiss, Германия).

Результаты

Всего проведено две серии экспериментов: первая серия в декабре 2020 г., вторая – в ноябре 2021 г. HUVEC, проанализированные в декабре 2020 г., имели характерную для ЭК вытянутую, продолговатую форму (так называемая картина «булыжной мостовой») и относительно небольшую размерность (рис. 1, A), сохраняя данные признаки на протяжении пассажирования и не обладая существенными отличиями в этом отношении от артериальных ЭК (рис. 1, B). По завершении соответствующих экспериментов (не относящихся к предмету данной статьи и поэтому не описанных в «Материалах и методах») ЭК заморожены и далее разморожены в ноябре 2021 г. В то же время после размораживания для другой серии экспериментов в ноябре 2021 г. в процессе культивирования при фазово-микроскопическом контроле обнаружена спонтанная и резкая смена вышеуказанного эндотелиального морфотипа на мезенхимальный, характеризующаяся выраженным удлинением формы

до веретеновидной (рис. 1, C), при этом одновременно культивируемые артериальные ЭК сохраняли вышеописанный эндотелиальный морфотип (рис. 1, D).

Было решено провести комплексный анализ данного феномена с использованием методов полуквантитативной оценки генной и белковой экспрессии, а также иммунофенотипирование с конфокальной микроскопией. Измерение генной экспрессии методом ОТ-кПЦР (табл. 3) показало, что HUVEC из первой серии экспериментов (с эндотелиальным морфотипом) имели классический профиль экспрессии генов эндотелиальных маркеров (*PECAM1*, *CDH5*, *VWF*, *ERG*) и общесосудистых маркеров (*HES1*, *HEY1*, *NRP1*), сопоставимый с первичными ЭК коронарной и внутренней грудной артерии. Следует отметить распространенное в литературе мнение о том, что ассоциированные с сигнальным путем Notch транскрипционные факторы *HES1* и *HEY1* считаются специфичными маркерами артериальной дифференцировки, что не является верным для ЭК человека во взрослом возрасте. Кроме того, экспрессия генов транскрипционных факторов (*NR2F2*, *PROX1*) и маркеров (*LYVE1*, *FLT4*) венозно-лимфатической дифференцировки

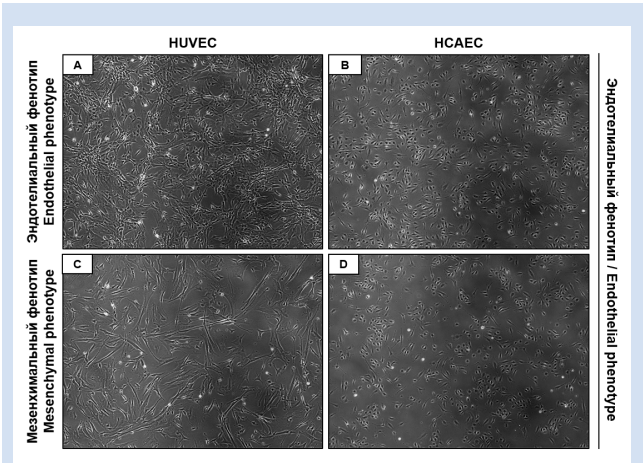


Рисунок 1. Фазово-контрастная микроскопия HUVEC и HCAEC в различных сериях экспериментов: A – HUVEC эндотелиального фенотипа (эксперимент 2020 г.); B – HCAEC эндотелиального фенотипа (эксперимент 2020 г.); C – HUVEC мезенхимального фенотипа (эксперимент 2021 г.); D – HCAEC эндотелиального фенотипа (эксперимент 2021 г.)
Figure 1. Phase contrast microscopy of HUVEC and HCAEC in different experimental series: A – HUVEC, endothelial appearance (2020); B – HCAEC, endothelial appearance (2020). C – HUVEC, mesenchymal appearance (2021). D – HCAEC, endothelial appearance (2021)

Таблица 2. Схема иммунофлюоресцентного окрашивания для иммунофенотипирования эндотелиальных клеток Table 2. Immunofluorescence stainings for the immunophenotyping of endothelial cells		
CD31 (ab9498) – Ms (1:500) α-SMA (ab5694) – Rb (1:250)	ERG (ab92513) – Rb (1:50) Smoothelin (ab8969) – Ms (1:100)	vWF (ab6994) – Rb (1:200) COL I (ab6308) – Ms (1:100)
VE-cadherin (2500) – Rb (1:250) SM-MHC (ab683) – Ms (1:250)	Snail + Slug (ab180714) – Rb (1:100) Twist1 (sc-81417) – Ms (1:50)	Днк anti-Rb 488 (ab150061), 1:500 Днк anti-Ms 555 (ab150110), 1:500

Примечание: каждая ячейка таблицы отражает одну лунку культурального планшета. Rb – антитела кроличьего происхождения (rabbit); Ms – антитела мышинного происхождения (mouse).
Note: each cell within the table reflects one well of cell culture plate. Rb and Ms – rabbit and mouse antibodies, respectively.

также существенно не отличалась между различными линиями ЭК (при этом высокие значения экспрессии демонстрировал лишь ген ключевого транскрипционного фактора венозной дифференцировки *NR2F2*). Функциональное состояние венозных ЭК не демонстрировало существенных отличий от артериальных, хотя венозные ЭК и характеризовались сниженной экспрессией нескольких провоспалительных генов (*VCAM1*, *SELP*, *CXCL8*, *CXCL1*), не имея при этом однозначно гиперэкспрессированных генов провоспалительных молекул. Экспрессия транскрипционных факторов эндотелиально-мезенхимального перехода, маркеров клеток мезенхимального ряда, маркеров сосудистой гладкомышечной дифференцировки и компонентов внеклеточного матрикса в венозных ЭК находилась на чрезвычайно низком уровне (за исключением гена виментина и, возможно, гена транскрипционного фактора *ZEB1*) и также значимо не отличалась от артериальных ЭК. Полученные результаты свидетельствовали в пользу классического эндотелиального фенотипа HUVEC и их незначительных функциональных отличиях от первичных артериальных ЭК, без какого-либо специфичного маркера.

Оценка генной экспрессии HUVEC из второй серии экспериментов (с мезенхимальным морфотипом) показала существенное отличие профиля их транскриптов как от параллельно культивируемых HCAEC и HITAEC, так и от HUVEC из первой серии экспериментов (с эндотелиальным морфотипом). В частности, HUVEC с мезенхимальным морфотипом характеризовались практически полной потерей экспрессии генов маркеров эндотелиального фенотипа *PECAM1*, *CDH5* и *VWF*, а также гена эндотелиального транскрипционного фактора *ERG* на фоне многократного повышения экспрессии генов транскрипционных факторов эндотелиально-мезенхимального перехода *SNAI2* и *TWIST1*

в сравнении с артериальными ЭК и с HUVEC эндотелиального морфотипа. В соответствии с этим в HUVEC мезенхимального морфотипа наблюдалось выраженное повышение экспрессии генов мезенхимальных маркеров *FAP* и *S100A4*, а также гена сосудистого гладкомышечного маркера *ACTA2* (кодирующего альфа-актин гладких мышц). Помимо этого, в данных клетках также зарегистрировано повышение экспрессии гена *VIM*, кодирующего цитоскелетный белок клеток мезенхимального ряда виментин, однако стоит отметить высокую базовую экспрессию этого гена в ЭК и обоснованные сомнения в отношении его специфичности как специфичного мезенхимального маркера. Необходимо подчеркнуть отсутствие повышения экспрессии в HUVEC мезенхимального морфотипа гена *CDH2*, кодирующего N-кадгерин, который зачастую упоминается в литературе как специфичный мезенхимальный белок и маркер эндотелиально-мезенхимального перехода, а также отсутствие повышения экспрессии генов иных маркеров сосудистого гладкомышечного фенотипа – *SMTN* и *MYH11*. Функциональная значимость эндотелиально-мезенхимального перехода в HUVEC подтверждена повышением экспрессии генов *COL1A1* и *COL1A2*, кодирующих различные субъединицы основного белка внеклеточного матрикса коллагена I типа, при этом экспрессии генов *COL4A1* и *COL4A2*, кодирующих субъединицы основного белка базальной мембраны коллагена IV типа, не выявлено.

По аналогии с первой серией экспериментов экспрессия генов транскрипционных факторов и маркеров венозно-лимфатической дифференцировки также не различалась между различными линиями ЭК (а относительно высоким уровнем экспрессии все так же характеризовался лишь ген транскрипционного фактора венозной дифференцировки *NR2F2*). В то же время обнаружено существенное снижение активности транскрипции генов

Таблица 3. Измерение генной экспрессии в первичных эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC) в различном функциональном состоянии по сравнению с положительным контролем (первичные эндотелиальные клетки коронарной артерии человека (HCAEC) и внутренней грудной артерии человека (HITAEC)) методом ОТ-кПЦР. Значения Δ Ct после нормализации на экспрессию генов «домашнего хозяйства» (*ACTB*, *GAPDH*, *B2M*)

Table 3. Measurement of the gene expression in primary human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) optionally undergoing EndoMT as compared to the positive control (primary human coronary artery endothelial cells and primary human internal thoracic artery endothelial cells) by means of reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction. Δ Ct values upon the normalisation by housekeeping genes (*ACTB*, *GAPDH*, *B2M*)

Класс молекул / Molecules	Ген / Gene	HCAEC	HITAEC	HUVEC	HCAEC	HITAEC	HUVEC
		Эксперимент № 1 (HUVEC в естественном эндотелиальном состоянии) / Experiment No. 1 (HUVEC of conventional phenotype)			Эксперимент № 2 (HUVEC в состоянии эндотелиально-мезенхимального перехода) / Experiment No. 2 (HUVEC undergoing EndoMT)		
Маркеры и транскрипционные факторы эндотелиальной дифференцировки / Markers and transcription factors of endothelial lineage	<i>PECAM1</i>	0,1220	0,1965	0,1292	1,2842	0,7204	0,0053
	<i>CDH5</i>	0,4247	0,5115	0,3053	0,5351	0,6237	0,0020
	<i>VWF</i>	0,1397	0,4895	0,1756	0,1884	0,6831	0,0035
	<i>ERG</i>	0,3770	0,1966	0,2447	0,1811	0,3351	0,002

Маркеры и транскрипционные факторы общесосудистой дифференцировки / Markers and transcriptional factors of vascular specification	<i>HES1</i>	0,0301	0,0295	0,0243	0,0112	0,0171	0,0005
	<i>HEY1</i>	0,0021	0,0050	0,0016	0,0005	0,0356	–
	<i>HEY2</i>	0,0053	0,0003	0,0001	0,0014	–	–
	<i>NRP1</i>	0,4580	0,4196	0,3691	0,3390	0,0848	0,6487
Маркеры и транскрипционные факторы венозно-лимфатической дифференцировки / Markers and transcription factors of venous and lymphatic commitment	<i>NR2F2</i>	0,2462	0,1627	0,2752	0,0617	0,0328	0,0654
	<i>PROX1</i>	0,0007	0,0130	0,0036	0,0002	0,0031	0,0004
	<i>LYVE1</i>	0,0016	0,0231	0,0166	0,0005	0,0527	0,0004
	<i>FLT4</i>	0,0025	0,0304	0,0099	0,0015	0,0342	0,0204
	<i>NRP2</i>	0,0036	0,0086	0,0036	0,0014	0,0099	0,0085
Синтез монооксида азота (NO) / Nitric oxide synthesis	<i>NOS3</i>	0,0066	0,0020	0,0015	0,0003	0,0082	0,0009
Рецепторы адгезии лейкоцитов к эндотелию / Endothelial receptors to leukocytes	<i>VCAM1</i>	0,0015	0,0098	0,0002	0,0007	0,0004	0,0003
	<i>ICAM1</i>	0,0050	0,0407	0,0115	0,0117	0,4316	0,0106
	<i>SELE</i>	0,0011	0,0481	0,0038	0,0017	0,1006	0,0002
	<i>SELP</i>	0,0025	0,0044	0,0001	0,0047	0,0003	0,0002
Эндотелиальные провоспалительные цитокины / Endothelial pro-inflammatory cytokines	<i>IL6</i>	0,0029	0,0007	0,0031	0,0033	0,0016	0,0011
	<i>CXCL8</i>	0,0701	0,0557	0,0219	0,0499	0,3480	0,0541
	<i>CCL2</i>	0,0279	0,2563	0,1098	0,1543	2,8119	0,0031
	<i>CXCL1</i>	0,0763	0,0651	0,0292	0,0925	0,1213	0,1106
	<i>MIF</i>	0,2152	0,0812	0,2155	0,0980	0,1547	1,1136
Эндотелиальное звено гемостаза / Endothelial haemostasis	<i>SERPINE1</i>	3,6637	2,1609	3,6921	1,5035	4,4012	4,1249
	<i>PLAU</i>	0,0028	0,0010	0,0015	0,0047	0,0040	0,0005
	<i>PLAT</i>	0,0120	0,0032	0,0041	0,0018	0,0025	0,1317
Транскрипционные факторы эндотелиальной механотрансдукции / Transcription factors of endothelial mechanotransduction	<i>KLF2</i>	0,0018	0,0004	0,0032	0,0007	0,0012	0,0011
	<i>KLF4</i>	0,0010	0,0005	0,0008	0,0014	0,0005	0,0167
	<i>NFE2L2</i>	0,0866	0,0523	0,0860	0,0188	0,0193	0,1436
Транскрипционные факторы эндотелиально-мезенхимального перехода / Transcription factors of endothelial-to-mesenchymal transition	<i>SNAIL</i>	0,0071	0,0121	0,0110	0,0190	0,0203	0,0055
	<i>SNAIL2</i>	0,0002	0,0001	0,0022	0,0225	0,0013	0,5898
	<i>TWIST1</i>	0,0004	0,00001	0,0001	0,0001	0,0002	0,0883
	<i>ZEB1</i>	0,0350	0,0343	0,0503	0,0224	0,0213	0,0420
Маркеры клеток мезенхимального ряда / Markers of mesenchymal specification	<i>CDH2</i>	0,0108	0,0028	0,0289	0,0721	0,0010	0,0151
	<i>VIM</i>	11,3684	2,9464	2,4013	2,8573	5,3552	15,1165
	<i>FAP</i>	0,00018	0,000019	0,000022	0,0008	–	0,0260
	<i>S100A4</i>	0,0005	0,00054	0,0006	0,00067	0,0027	0,0671
Маркеры гладкомышечной дифференцировки / Markers of vascular smooth muscle cell lineage	<i>ACTA2</i>	0,0078	0,0016	0,0030	0,0028	0,0020	0,1090
	<i>SMTN</i>	0,0035	0,0016	0,0015	0,00088	0,0032	0,0080
	<i>MYH11</i>	0,00025	0,00013	0,000033	–	–	0,000012
Компоненты внеклеточного матрикса / Extracellular matrix components	<i>COL1A1</i>	0,0008	0,000041	0,00152	0,0001	0,0001	0,9703
	<i>COL1A2</i>	0,0018	0,00034	0,00228	0,000082	0,0024	2,6371
Компоненты базальной мембраны / Basement membrane components	<i>COL4A1</i>	0,1201	0,1460	0,0188	0,0243	0,3731	0,1190
	<i>COL4A2</i>	0,0007	0,0072	0,0008	0,0001	0,0130	–

ОРИГИНАЛЬНЫЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ

общесосудистой дифференцировки *HES1* и *HEY1* (при этом транскрипция гена рецепторного убиквитарного белка сосудистых клеток *NRP1* не снижалась). Не выявлено существенных различий в экспрессии гена эндотелиальной NO-синтазы (*NOS3*) и генов, ответственных за провоспалительную активацию эндотелия, хотя в отношении экспрессии последних в HUVEC мезенхимального морфотипа наблюдался некоторый сдвиг, характеризовавшийся резким снижением экспрессии гена моноцитарного хемоаттрактантного белка *CCL2* и выраженным повышением экспрессии гена фактора ингибирования миграции макрофагов *MIF*. Кроме того, в HUVEC мезенхимального морфотипа отмечено многократное повышение экспрессии гена тканевого активатора плазминогена *PLAT* (эндотелиальное звено гемостаза) и генов атеропротективных транскрипционных факторов эндотелиальной механотрансдукции *KLF4* и *NFE2L2* – как в сравнении с артериальными ЭК, так и с первой серией экспериментов.

Результаты скрининга генной экспрессии (см. табл. 3) подтверждены при анализе экспрессии соответствующих белков методом иммуноблоттинга (рис. 2). В частности, в лизате HUVEC мезенхимального морфотипа не наблюдалось экспрессии эндотелиальных маркеров CD31/PECAM1 и VE-кадгерина, а также транскрипционного фактора эндотелиальной дифференцировки ERG. Вместе с тем в данных клетках выявлена сохранная экспрессия убиквитарного сосудистого транскрипционного фактора *HES1* и убиквитарного сосудистого белка *NRP1*, являющегося корецептором к фактору роста сосудистого эндотелия (VEGF). В соответствии с результатами анализа генной экспрессии, экспрессия рецептора ЭК для лейкоцитов ICAM1 была значительно выше в HITAEC, что в совокупности с равной загрузкой (отсутствие различий в экспрессии убиквитарного ядерного белка YY1) подтверждает техническую валидность полученных результатов.

С целью визуализации различий между артериальными ЭК (среди культур которых не отмечено случаев эндотелиально-мезенхимального перехода за несколько лет активной работы) HUVEC эндотелиального фенотипа и HUVEC мезенхимального морфотипа проведено иммунофлюоресцентное окрашивание на ряд специфичных маркеров и транскрипционных факторов эндотелиального и мезенхимального фенотипов, эндотелиально-мезенхимального перехода. Сочетанное окрашивание на эндотелиальный маркер CD31/PECAM1 и маркер сосудистых гладкомышечных клеток (также относящихся к клеткам мезенхимального ряда) альфа-актин гладких мышц (α -SMA) показало потерю экспрессии CD31/PECAM1 в HUVEC мезенхимального морфотипа, однако экспрессии

α -SMA также не отмечено (рис. 3, A). По результатам последующих окрашиваний на эндотелиальный белок межклеточных контактов VE-кадгерин (кодируемый геном *CDH5*) и транскрипционный фактор эндотелиальной дифференцировки ERG в сочетании со специфичными маркерами сосудистой гладкомышечной дифференцировки тяжелой цепью миозина гладких мышц (SM-MHC) и смузеллина (smoothelin) не обнаружено данных молекул в HUVEC мезенхимального морфотипа (рис. 3, B, C), что подтверждает окончательную потерю ими эндотелиального фенотипа, при этом не свидетельствуя в пользу сосудистой гладкомышечной дифференцировки. Положительное окрашивание на коллаген I типа продемонстрировало мезенхимальный фенотип спонтанно трансформированных HUVEC и приобретение ими способности к синтезу компонентов внеклеточного матрикса (рис. 3, D). Окрашивание вторичными антителами в отсутствие каких-либо первичных антител подтвердило высокую специфичность иммунофлюоресцентного сигнала (рис. 3, E).

Таким образом, результаты анализа белковой экспрессии различными методами подтвердили результаты анализа генной экспрессии, в совокупности свидетельствуя о: 1) потере эндотелиального фенотипа на уровне как транскрипционных факторов, так и рецепторных маркеров; 2) приобретении основного функционального признака мезенхимального фенотипа – высокой активности синтеза компонентов внеклеточного матрикса. Вероятнее всего, трансдифференцировка HUVEC в процессе эндотелиально-мезенхимального перехода постепенно шла в направлении миофибробластного фенотипа (что подтверждается отсутствием экспрессии

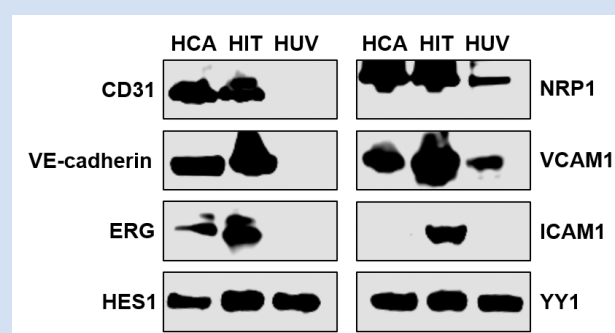


Рисунок 2. Определение экспрессии эндотелиальных маркеров (CD31 и VE-кадгерин), транскрипционного фактора эндотелиальной дифференцировки ERG, транскрипционного фактора (*HES1*) и убиквитарного рецепторного белка (*NRP1*) общесосудистой дифференцировки, рецепторов адгезии эндотелиальных клеток для лейкоцитов (*VCAM1* и *ICAM1*) и ядерного белка «домашнего хозяйства» (*YY1*, контроль загрузки). Иммуноблоттинг

Figure 2. Expression of endothelial markers (CD31 and VE-cadherin), ERG transcription factor (endothelial differentiation), *HES1* transcription factor (vascular differentiation), *NRP1* vascular ubiquitous protein, endothelial receptors for leukocytes (*VCAM1* and *ICAM1*), and nuclear housekeeping protein (*YY1*, loading control). Western blotting

генов двух специфичных сократительных маркеров – SM-MHC и смузелина в сочетании с одновременной высокой экспрессией генов, кодирующих α -SMA и фибробласт-специфичный белок (S100A4), а также активным синтезом коллагена I типа). В дополнение к этому сохранность экспрессии убиквитарных сосудистых маркеров HES1 и NRP1 также позволяет говорить о схожести подвергшихся эндотелиально-мезенхимальному переходу HUVEC с миофибробластами или сосудистыми гладкомышечными клетками синтетического фенотипа внутри неонтимы.

Обсуждение

В данной работе рассмотрен случай спонтанного эндотелиально-мезенхимального перехода неясной этиологии, произошедший с HUVEC в процессе рутинного культивирования. Одной из вероятных причин перехода в данном случае может быть прямое культивирование HUVEC на культуральном пластике в отсутствие адгезивного покрытия из коллагена IV типа, фибронектина или ламинина, однако в то же время следует отметить, что первичные артериальные ЭК (HCAEC и HITAEC) ни разу не подвергались эндотелиально-мезенхимальному переходу в аналогичных условиях культивирования на протяжении нескольких лет рутинной работы, а в рекомендациях производителя (Cell Applications) по культивированию конкретно данного наименования HUVEC (200K-05f) о необ-

ходимости осуществлять их культивирование на белковой подложке ничего не сказано. Другой причиной может быть некоторое несоответствие рекомендуемой для культивирования данного наименования HUVEC культуральной среды (MesoEndo Growth Medium, 212–500, Cell Applications вместо Endothelial Cell Growth Medium, 211-500 или 213–500, Cell Applications). К сожалению, точный состав данных эндотелиальных сред производитель не раскрывает, хотя с большой долей вероятности они приблизительно соответствуют аналогичным средам EGM-2 (Endothelial Growth Medium-2) и EGM-2MV (Endothelial Growth Medium-2 Microvascular) от компании Lonza, состав которых находится в открытом доступе. Тем не менее данные среды являются принципиально близкими. Среда MesoEndo Growth Medium рекомендована производителем для культивирования ЭК брахиоцефальной, сонной, коронарной, внутренней грудной, подключичной и пупочной артерий, среда Endothelial Cell Growth Medium – для культивирования ЭК аорты, бедренной и легочной артерий, пупочной вены (таким образом, обе среды могут быть использованы для культивирования клеток сосудов различного диаметра). Кроме того, эндотелиальные среды в целом характеризуются взаимозаменяемостью (к примеру, та же среда EGM-2MV рекомендована производителем Lonza для культивирования ЭК аорты, коронарной артерии и более мелких артерий, а личный опыт авторов статьи позволяет утверждать

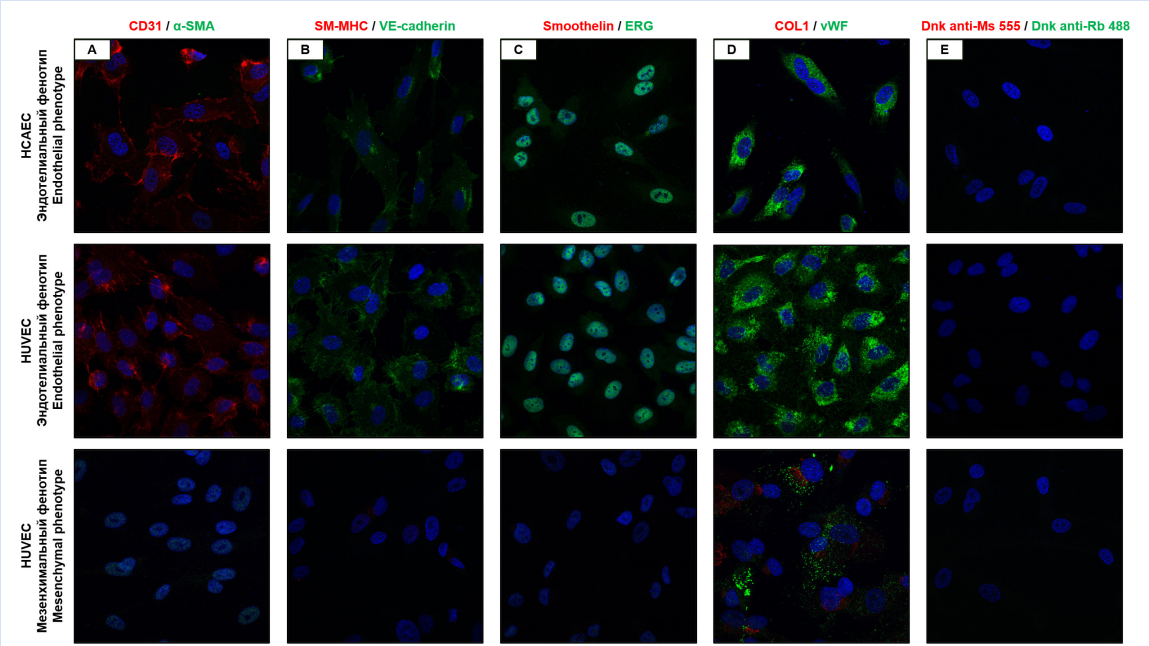


Рисунок 3. Иммунофлуоресцентное окрашивание HCAEC и HUVEC на маркеры эндотелиального и мезенхимального фенотипов: *A* – CD31 и альфа-актин гладких мышц (α -SMA); *B* – VE-кадгерин и тяжелые цепи миозина гладких мышц (SM-MHC); *C* – транскрипционный фактор ERG и смузелин (smoothelin); *D* – фактор фон Виллебранда (vWF) и основной компонент межклеточного матрикса коллаген I типа (COL1); *E* – отрицательный контроль

Figure 3. Immunofluorescence staining of HCAEC and HUVEC for the markers of endothelial and mesenchymal phenotype: *A*, CD31 and alpha smooth muscle actin (α -SMA); *B* – VE-cadherin and smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC); *C* – ERG transcription factor and smoothelin; *D* – von Willebrand factor and major extracellular matrix component type I collagen; *E* – negative control

о возможности использовании среды ECM (Endothelial Cell Medium) от компании ScienCell для культивирования клеток от компании Cell Applications. Поэтому с уверенностью говорить о причинах эндотелиально-мезенхимального перехода в данной культуре HUVEC затруднительно.

В экспериментальных условиях эндотелиально-мезенхимальный переход индуцируют при помощи добавления трансформирующего фактора роста (TGF-β) [10–12], неселективного ингибитора NO-синтазы L-NAME в сочетании с ангиотензином II [13, 14], активации сигнального пути Notch [15–17] или путем введения в эксперимент гипоксических условий [18, 19]. В данном случае в культуральную среду не добавляли никаких специфических активаторов или ингибиторов, а состав атмосферы внутри инкубатора поддерживали на стандартном уровне (95% воздуха: 5% CO₂). Несмотря на активное изучение процесса эндотелиально-мезенхимального перехода в англоязычной научной литературе [20–24], практические рекомендации по методологии его определения в культуре в русскоязычной печати до настоящего момента отсутствовали. Учитывая наличие случая явного и спонтанного эндотелиально-мезенхимального перехода, выявленного в процессе рутинного культивирования HUVEC, а также наличие различных линий артериальных ЭК в дополнение к HUVEC и биоматериала (РНК и общий белок) от этой же линии HUVEC на стадии эндотелиального фенотипа, авторы данной работы поставили перед собой задачу разработки алгоритма и анализа применимости конкретных инструментов (в первую очередь праймеров и сочетаний маркеров для иммунофлюоресцентного окрашивания) для детекции эндотелиально-мезенхимального перехода *in vitro*.

Результаты анализа генной экспрессии позволили прийти к нескольким интересным с практической точки зрения выводам. Первым из них стало явное очерчивание набора эндотелиальных маркеров (CD31/PECAM1, CDH5, VWF, ERG), включающих два рецептора (CD31/PECAM1 и VE-кадгерин/

CDH5), запасаемый в тельцах Вайбеля – Паладе цитозольный белок (фактор фон Виллебранда, VWF) и транскрипционный фактор эндотелиальной дифференцировки (ERG). При этом стоит подчеркнуть принципиальную важность дифференцировки специфичных эндотелиальных маркеров (CD31/PECAM1, CDH5, VWF, ERG) от общесосудистых, к которым на основании данного исследования целесообразно отнести NRP1 (как убиквитарный рецепторный белок), а также HES1 и HEY1 (транскрипционные факторы сигнального пути Notch). Экспрессии гена транскрипционного фактора *HEY2* при рутинном культивировании первичных артериальных и венозных ЭК не выявлено, что свидетельствует в пользу его преимущественной важности в биологии индивидуального развития в сравнении с физиологией во взрослом возрасте.

Вторым значимым выводом стало выдвинутое нами в параллельно опубликованной в этом номере журнала работе подтверждение отсутствия специфичности маркеров артериальной и венозно-лимфатической дифференцировки во взрослом возрасте. Согласно данным литературы, к маркерам артериальной дифференцировки относят транскрипционные факторы сигнального пути Notch (HES1, HEY1, HEY2), транскрипционный фактор ERG (также регулирующий программу сигнального пути Notch) и NRP1, являющийся корецептором к VEGF, а к маркерам венозно-лимфатической дифференцировки – транскрипционный фактор COUP-TFII (кодируемый геном *NR2F2* и часто рассматриваемый как специфичный транскрипционный фактор венозной дифференцировки), корецептор к фактору роста сосудистого эндотелия NRP2 (также считаемый более специфичным для вен), транскрипционный фактор PROX1 (рассматриваемый как специфичный транскрипционный фактор лимфатической дифференцировки), рецепторный белок VEGFR3 и мембранный белок LYVE1 (также считаемые более специфичными для лимфатических сосудов) [25–27]. Анализ генной экспрессии показал, что практически все гены, кодирующие

Таблица 4. Панель генов для определения эндотелиально-мезенхимального перехода Table 4. Minimum required markers of endothelial-to-mesenchymal transition	
Класс молекул / Molecules	Гены / Genes
Маркеры и транскрипционные факторы эндотелиальной дифференцировки / Markers and transcription factors of endothelial lineage	<i>PECAM1, CDH5, VWF, ERG</i>
Транскрипционные факторы эндотелиально-мезенхимального перехода / Transcription factors of endothelial-to-mesenchymal transition	<i>SNAI2, TWIST1</i>
Маркеры клеток мезенхимального ряда / Markers of mesenchymal lineage	<i>FAP, S100A4</i>
Маркеры сосудистой гладкомышечной дифференцировки / Markers of vascular smooth muscle cell lineage	<i>ACTA2</i>
Компоненты внеклеточного матрикса / Extracellular matrix components	<i>COL1A1, COL1A2</i>
Примечание: АПФ – ангиотензинпревращающий фермент; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ИКМП – ишемическая кардиомиопатия. Note: CHD – coronary heart disease; ICM – ischemic cardiomyopathy; ACE – angiotensin converting enzyme.	

указанные молекулы (*HES1*, *HEY1*, *ERG*, *NRP1*, *NRP2*, *NR2F2*, *PROX1*, *FLT4* и *LYVE1*), экспрессируются во всех линиях артериальных клеток без существенных различий в величине экспрессии. Возможно, что специфичные для отдельных направлений эндотелиальной дифференцировки маркеры во взрослом возрасте все же существуют, однако данный вопрос требует сравнительного анализа протеома как культур венозных и артериальных ЭК *in vitro*, так и лизата венозного и артериального эндотелия (что затруднено вследствие высокой вероятности контаминации белками сосудистых гладкомышечных клеток). Ранее нашей группой проведен сравнительный биоинформатический анализ транскриптома HCAEC и HUVEC, однако количество молекул-кандидатов при транскриптомном анализе кратно превышает таковое при анализе протеома. Кроме того, между транскриптами и белками лежит целый ряд этапов модуляции молекулярной экспрессии, включая: 1) регуляцию стабильности мРНК (скорости ее деградации), в том числе механизм микроРНК; 2) экспорт мРНК из ядра в цитоплазму; 3) посттранскрипционное редактирование РНК (замену одних нуклеозидов на другие) и эпитранскриптомные модификации РНК (функционально значимые модификации РНК без замены нуклеозидов); 4) регуляцию стадий самого процесса трансляции (инициации, элонгации и терминации) [28]. Такая многоэтапность (причем каждый этап также подвергается тщательному контролю) регуляции экспрессии молекул между транскриптами и белками неизбежно приводит к сокращению числа молекул-кандидатов и обогащению их патофизиологической значимости (поскольку в конечном счете центральной сигнальной молекулой является белок, а не РНК) при анализе протеома в сравнении с анализом транскриптома.

Третьим выводом стало отсутствие явно выраженной провоспалительной активации при эндотелиально-мезенхимальном переходе, которое часто описывается в литературе [1–5, 20–24]. Анализ рецепторов ЭК для лейкоцитов (в первую очередь VCAM1 и ICAM1) не выявил повышения их экспрессии как на генном, так и белковом уровнях при эндотелиально-мезенхимальном переходе в HUVEC. Аналогичные результаты получены при сравнении экспрессии генов основных эндотелиальных провоспалительных цитокинов (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*); хотя HUVEC в состоянии эндотелиально-мезенхимального перехода характеризовались сниженным уровнем экспрессии гена *CCL2* и повышенным уровнем экспрессии гена *MIF* в сравнении как с HUVEC вне данного перехода, так и параллельно культивируемыми артериальными ЭК, такой сдвиг сложно однозначно назвать провоспалительным. Безусловно, эндотелиально-мезенхимальный переход имеет значимые

функциональные последствия (о которых пойдет речь ниже), однако данный эксперимент не позволяет отнести к ним провоспалительную активацию подвергшихся переходу клеток. Результаты в отношении эндотелиального звена гемостаза и транскрипционных факторов механотрансдукции не вполне однозначны (скорее, свидетельствуют об антитромботическом и антиатерогенном фенотипах подвергшихся эндотелиально-мезенхимальному переходу клеток), однако основаны исключительно на данных анализа генной экспрессии и поэтому не обладают достаточной доказательностью.

Более важным является идентификация конкретных транскрипционных факторов, ответственных за эндотелиально-мезенхимальный переход в ЭК. Всего в литературе выделяют пять основных транскрипционных факторов, вызывающих эндотелиально-мезенхимальный переход: Snail (кодируемый геном *SNAIL1*), Slug (кодируемый геном *SNAIL2*), а также Twist1, Zeb1 и Gata4 (кодируемые одноименными генами) [1–5, 20–24]. Ранние исследования нашей группы показали, что транскрипционный фактор Gata4 не экспрессируется ЭК (данные не показаны), поэтому в молекулярную панель для профилирования генной экспрессии были включены лишь первые четыре транскрипционных фактора, из которых гиперэкспрессированы при переходе в HUVEC два – Slug (*SNAIL2*) и Twist1 (*TWIST1*). К сожалению, анализ белкового лизата ЭК методом иммуноблоттинга не показал присутствия Snail, Slug и Twist1 независимо от линии ЭК, однако кратность различий при измерении генной экспрессии позволяет с уверенностью говорить об идентификации Slug и Twist1 как ключевых транскрипционных факторов эндотелиально-мезенхимального перехода.

В отношении маркеров клеток мезенхимального ряда следует отметить неспецифичность белка межклеточных контактов N-кадгерина, традиционно относимого к маркерам эндотелиально-мезенхимального перехода и противопоставляемого другому белку межклеточных контактов – VE-кадгерину. Не вполне однозначным маркером также является белок цитоскелета клеток мезенхимального ряда виментин, который характеризуется высокой экспрессией во всех видах ЭК, хотя экспрессия кодирующего его гена и кратно повышалась при эндотелиально-мезенхимальном переходе. Оптимальными маркерами клеток мезенхимального ряда и конкретно эндотелиально-мезенхимального перехода следует считать фибробласт-ассоциированный белок (FAP) и фибробласт-специфичный белок (FSP-1), гены которых (*FAP* и *S100A4*) были гиперэкспрессированы при переходе в HUVEC и также являются, по данным литературы, наиболее специфичными маркерами клеток мезенхимального ряда [29]. С позиции авторов большой интерес представляют различия в экспрессии маркеров

сосудистого гладкомышечного дифферона – α -SMA, ген которого (*ACTA2*) характеризовался выраженной гиперэкспрессией при эндотелиально-мезенхимальном переходе в HUVEC, и смузелина с тяжелой цепью миозина гладких мышц (SM-MHC), гены которых (*SMTN* и *MYH11*) не экспрессировались при переходе и являются, по данным литературы, специфическими маркерами сосудистых гладкомышечных клеток сократительного фенотипа [30]. В сочетании с на порядки большей экспрессией генов компонентов внеклеточного матрикса (*COL1A1* и *COL1A2*) и сохранностью экспрессии генов общесосудистых маркеров (*HES1* и *NRP1*) при эндотелиально-мезенхимальном переходе в HUVEC это указывает на принципиальную схожесть подвергшихся переходу HUVEC с миофибробластами неоинтимы, которые также характеризуются сочетанной экспрессией α -SMA (ген *ACTA2*), FAP/FSP-1 (гены *FAP* и *S100A4*), коллагена I типа (гены субъединиц *COL1A1* и *COL1A2*) и общесосудистых маркеров (*HES1* и *NRP1*) в сочетании с отсутствием экспрессии специфических сократительных белков смузелина (ген *SMTN*) и SM-MHC (ген *MYH11*), а также эндотелиальных маркеров (CD31/PECAM1, VE-кадгерина/CDH5, VWF и ERG).

С методологической стороны вопроса следует отметить высокую применимость профилирования генной экспрессии (ОТ-кПЦР) в сравнении с белковой (иммуноблоттинг) конкретно в случае задачи рутинной характеристики эндотелиально-мезенхимального перехода. Рекомендуемая схема профилирования (которое возможно осуществлять при помощи представленных в табл. 1 праймеров) приведена в табл. 4. Следует отметить, что при любых экспериментах с эндотелиально-мезенхимальным переходом независимо от их дизайна необходимо иметь отрицательный контроль – исследуемые клеточные культуры до перехода.

Кроме того, важно выделить схемы иммунофлюоресцентного окрашивания, информативные и достаточные для определения эндотелиально-мезенхимального перехода. Надлежащую доказательную базу этого обеспечивает окрашивание на любой из эндотелиальных мембранных маркеров (CD31/PECAM-1 или VE-кадгерин) и транскрипционный фактор эндотелиальной дифференцировки (ERG) в сочетании с маркером синтетического фенотипа (к примеру, коллагеном I типа). Сутью такого варианта окрашивания является демонстрация потери эндотелиального фенотипа в сочетании с приобретением основного компонента мезенхимального фенотипа – способности к синтезу компонентов внеклеточного матрикса.

В заключение следует отметить, что предлагаемый алгоритм и инструменты для определения эндотелиально-мезенхимального перехода *in vitro* лишь частично подходят для детекции данного пе-

рехода *in vivo*. Выделение эндотелиального лизата при помощи промывки RIPA или T-PER-буфером с последующим измерением уровня генной экспрессии неминуемо сопряжено с контаминацией белками сосудистых гладкомышечных клеток даже у крыс (монослой ЭК которых отделен от мышечной оболочки внутренней эластической мембраной), что может привести к ложноположительным результатам вследствие попадания гладкомышечных транскриптов в эндотелиальный лизат. Вероятно, наиболее подходящим способом определения эндотелиально-мезенхимального перехода *in vivo* является эксплантация сосудистых сегментов интереса с последующим иммунофлюоресцентным окрашиванием *en face* (цельные сегменты с монтированием на предметное стекло интимой вверх) и использованием тех же схем окрашивания, что и *in vitro*. В то же время, поскольку такой способ приводит к малоэффективному использованию экспериментального биоматериала (один сосудистый сегмент на одно окрашивание), вероятно, целесообразно сократить количество окрашиваний до одного – двух (CD31/PECAM-1 или ERG в сочетании с коллагеном I типа). Преимущество данного способа состоит в высокой точности определения эндотелиально-мезенхимального перехода, так как подавляющее большинство ЭК даже в патологических условиях организма сохраняют эндотелиальный фенотип.

Заключение

В данном исследовании при помощи различных методов молекулярной и клеточной биологии проанализирован случай спонтанного эндотелиально-мезенхимального перехода при рутинном культивировании HUVEC, изучено функциональное состояние клеток до и после перехода, впервые в русскоязычной научной литературе продемонстрирован алгоритм и предложены инструменты (панель генов для оценки генной экспрессии и схемы иммунофлюоресцентного окрашивания) для определения эндотелиально-мезенхимального перехода *in vitro*, спрогнозирована возможность их применения для характеристики перехода *in vivo*. При исследовании профилей генной экспрессии различных артериальных и венозных ЭК поставлен вопрос необходимости идентификации специфичных артериальных и венозных маркеров, предложена соответствующая методология (анализ протеома соответствующих клеточных линий *in vitro* и лизата ЭК *in vivo*). Маркеры эндотелиального фенотипа отделены от маркеров общесосудистого фенотипа, разграничены по специфичности маркеры сосудистого гладкомышечного фенотипа и маркеры клеток мезенхимального ряда. Определены транскрипционные факторы, ответственные за управление транскрипционной программой эндотелиально-мезенхимального перехода конкретно в рассматриваемом клеточном сценарии.

Конфликт интересов

Д.К. Шишкова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.В. Синицкая заявляет об отсутствии конфликта интересов. М.Ю. Синицкий заявляет об отсутствии конфликта интересов. В.Г. Матвеева заявляет об отсутствии конфликта интересов. Е.А. Великанова заявляет об отсутствии конфликта интересов. В.Е. Маркова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Г. Кутихин заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке комплексной

программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2021-001 «Разработка новых фармакологических подходов к экспериментальной терапии атеросклероза и комплексных цифровых решений на основе искусственного интеллекта для автоматизированной диагностики патологий системы кровообращения и определения риска летального исхода» при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках национального проекта «Наука и университеты».

Информация об авторах

Шишкова Дарья Кирилловна, кандидат биологических наук научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1518-3888

Синицкая Анна Викторовна, кандидат биологических наук научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-4467-8732

Синицкий Максим Юрьевич, кандидат биологических наук старший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-4824-2418

Матвеева Вера Геннадьевна, кандидат медицинских наук старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-4146-3373

Великанова Елена Анатольевна, кандидат биологических наук научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1079-1956

Маркова Виктория Евгеньевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-6652-5745

Кутихин Антон Геннадьевич, кандидат медицинских наук заведующий лабораторией молекулярной, трансляционной и цифровой медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

Author Information Form

Shishkova Daria K., PhD, Researcher at the Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1518-3888

Sinitskaya Anna V., PhD, Researcher at the Laboratory for Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4467-8732

Sinitsky Maxim Yu., PhD, Senior Researcher at the Laboratory for Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4824-2418

Matveeva Vera G., MD, PhD, Senior Researcher at the Laboratory for Tissue Engineering, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4146-3373

Velikanova Elena A., PhD, Researcher at the Laboratory for Tissue Engineering, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1079-1956

Markova Victoria E., PhD, Researcher at the Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-6652-5745

Kutikhin Anton G., MD, PhD, Head of the Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

Вклад авторов в статью

ШДК – вклад в концепцию и дизайна исследования, получение данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

САВ – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

СМЮ – анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

МВГ – анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ВЕА – анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

МВЕ – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

КАГ – вклад в концепцию и дизайна исследования, получение данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Contribution Statement

ShDK – contribution to the concept and design of the study, data collection, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

SAV – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

SMYu – data analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

MVG – data analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

VEA – data analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

MVE – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

KAG – contribution to the concept and design of the study, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Li Y., Lui K.O., Zhou B. Reassessing endothelial-to-mesenchymal transition in cardiovascular diseases. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(8):445-456. doi: 10.1038/s41569-018-0023-y.
- Kovacic J.C., Dimmeler S., Harvey R.P., Finkel T., Aikawa E., Krenning G., Baker A.H. Endothelial to Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol.* 2019;73(2):190-209. doi: 10.1016/j.jacc.2018.09.089.
- Chen P.Y., Schwartz M.A., Simons M. Endothelial-to-Mesenchymal Transition, Vascular Inflammation, and Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med.* 2020;7:53. doi: 10.3389/fcvm.2020.00053.
- Alvandi Z., Bischoff J. Endothelial-Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(9):2357-2369. doi: 10.1161/ATVBAHA.121.313788.
- Peng Q., Shan D., Cui K., Li K., Zhu B., Wu H., Wang B., Wong S., Norton V., Dong Y., Lu Y.W., Zhou C., Chen H. The Role of Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease. *Cells.* 2022;11(11):1834. doi: 10.3390/cells11111834.
- Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Velikanova E.A., Sinitsky M.Y., Sinitskaya A.V., Markova V.E. Endothelial Dysfunction in the Context of Blood-Brain Barrier Modeling. *J Evol Biochem Physiol.* 2022;58(3):781-806. doi: 10.1134/S0022093022030139.
- Kutikhin A.G., Tupikin A.E., Matveeva V.G., Shishkova D.K., Antonova L.V., Kabilov M.R., Velikanova E.A. Human Peripheral Blood-Derived Endothelial Colony-Forming Cells Are Highly Similar to Mature Vascular Endothelial Cells yet Demonstrate a Transitional Transcriptomic Signature. *Cells.* 2020;9(4):876. doi: 10.3390/cells9040876.
- Ханова М.Ю., Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Кривкина Е.О., Глушкова Т.В., Севостьянова В.В., Кутихин А.Г., Антонова Л.В. Формирование монослоя эндотелиальных клеток на поверхности сосудистого протеза малого диаметра в условиях потока. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2021. Т. 23. № 3. С. 101-114. doi: 10.15825/1995-1191-2021-3-101-114.
- Mukhamadiyarov R.A., Bogdanov L.A., Glushkova T.V., Shishkova D.K., Kostyunin A.E., Koshelev V.A., Shabaev A.R., Frolov A.V., Stasev A.N., Lyapin A.A., Kutikhin A.G. Embedding and Backscattered Scanning Electron Microscopy: A Detailed Protocol for the Whole-Specimen, High-Resolution Analysis of Cardiovascular Tissues. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:739549. doi: 10.3389/fcvm.2021.739549.
- Ma J., Sanchez-Duffhues G., Goumans M.J., Ten Dijke P. TGF- β -Induced Endothelial to Mesenchymal Transition in Disease and Tissue Engineering. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:260. doi: 10.3389/fcell.2020.00260.
- Ma J., van der Zon G., Gonçalves M.A.F.V., van Dinther M., Thorikay M., Sanchez-Duffhues G., Ten Dijke P. TGF- β -Induced Endothelial to Mesenchymal Transition Is Determined by a Balance Between SNAI1 and ID Factors. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:616610. doi: 10.3389/fcell.2021.616610.
- Ma J., van der Zon G., Sanchez-Duffhues G., Ten Dijke P. TGF- β -mediated Endothelial to Mesenchymal Transition (EndMT) and the Functional Assessment of EndMT Effectors using CRISPR/Cas9 Gene Editing. *J Vis Exp.* 2021;(168). doi: 10.3791/62198.
- Krishnamoorthi M.K., Thandavarayan R.A., Youker K.A., Bhimaraj A. An In Vitro Platform to Study Reversible Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *Front Pharmacol.* 2022;13:912660. doi: 10.3389/fphar.2022.912660.
- Tang R., Li Q., Lv L., Dai H., Zheng M., Ma K., Liu B. Angiotensin II mediates the high-glucose-induced endothelial-to-mesenchymal transition in human aortic endothelial cells. *Cardiovasc Diabetol.* 2010;9:31. doi: 10.1186/1475-2840-9-31.
- Noseda M., McLean G., Niessen K., Chang L., Pollet I., Montpetit R., Shahidi R., Dorovini-Zis K., Li L., Beckstead B., Durand R.E., Hoodless P.A., Karsan A. Notch activation results in phenotypic and functional changes consistent with endothelial-to-mesenchymal transformation. *Circ Res.* 2004;94(7):910-7. doi: 10.1161/01.RES.0000124300.76171.C9.
- Chang A.C., Fu Y., Garside V.C., Niessen K., Chang L., Fuller M., Setiadi A., Smrz J., Kyle A., Minchinton A., Marra M., Hoodless P.A., Karsan A. Notch initiates the endothelial-to-mesenchymal transition in the atrioventricular canal through autocrine activation of soluble guanylyl cyclase. *Dev Cell.* 2011;21(2):288-300. doi: 10.1016/j.devcel.2011.06.022.

17. Kostina A.S., Uspensky V.E., Irtyuga O.B., Ignatieva E.V., Freylikhman O., Gavriliuk N.D., Moiseeva O.M., Zhuk S., Tomilin A., Kostareva A.A., Malashicheva A.B. Notch-dependent EMT is attenuated in patients with aortic aneurysm and bicuspid aortic valve. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(4):733-740. doi: 10.1016/j.bbdis.2016.02.006.

18. Xu X., Tan X., Tampe B., Sanchez E., Zeisberg M., Zeisberg E.M. Snail Is a Direct Target of Hypoxia-inducible Factor 1 α (HIF1 α) in Hypoxia-induced Endothelial to Mesenchymal Transition of Human Coronary Endothelial Cells. *J Biol Chem*. 2015;290(27):16653-64. doi: 10.1074/jbc.M115.636944.

19. Tang H., Babicheva A., McDermott K.M., Gu Y., Ayon R.J., Song S., Wang Z., Gupta A., Zhou T., Sun X., Dash S., Wang Z., Balistreri A., Zheng Q., Cordery A.G., Desai A.A., Rischard F., Khalpey Z., Wang J., Black S.M., Garcia J.G.N., Makino A., Yuan J.X. Endothelial HIF-2 α contributes to severe pulmonary hypertension due to endothelial-to-mesenchymal transition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2018;314(2):L256-L275. doi: 10.1152/ajplung.00096.2017.

20. Dejana E., Hirschi K.K., Simons M. The molecular basis of endothelial cell plasticity. *Nat Commun*. 2017;8:14361. doi: 10.1038/ncomms14361.

21. Piera-Velazquez S., Jimenez S.A. Endothelial to Mesenchymal Transition: Role in Physiology and in the Pathogenesis of Human Diseases. *Physiol Rev*. 2019;99(2):1281-1324. doi: 10.1152/physrev.00021.2018.

22. Gao Y., Galis Z.S. Exploring the Role of Endothelial Cell Resilience in Cardiovascular Health and Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021;41(1):179-185. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314346.

23. Greenspan L.J., Weinstein B.M. To be or not to be: endothelial cell plasticity in development, repair, and disease.

Angiogenesis. 2021;24(2):251-269. doi: 10.1007/s10456-020-09761-7.

24. Великанова Е.А., Кутихин А.Г., Матвеева В.Г., Тупикин А.Е., Кабилов М.Р., Антонова Л.В. Сравнение профиля генной экспрессии колониеформирующих эндотелиальных клеток из периферической крови человека и эндотелиальных клеток коронарной артерии. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2020; 9(2): 74-81. doi: 10.17802/2306-1278-2020-9-2-74-81.

25. Niklason L., Dai G. Arterial Venous Differentiation for Vascular Bioengineering. *Annu Rev Biomed Eng*. 2018;20:431-447. doi: 10.1146/annurev-bioeng-062117-121231.

26. Wolf K., Hu H., Isaji T., Dardik A. Molecular identity of arteries, veins, and lymphatics. *J Vasc Surg*. 2019;69(1):253-262. doi: 10.1016/j.jvs.2018.06.195.

27. Marziano C., Genet G., Hirschi K.K. Vascular endothelial cell specification in health and disease. *Angiogenesis*. 2021;24(2):213-236. doi: 10.1007/s10456-021-09785-7.

28. Corbett A.H. Post-transcriptional regulation of gene expression and human disease. *Curr Opin Cell Biol*. 2018;52:96-104. doi: 10.1016/j.ceb.2018.02.011.

29. Evrard S.M., Lecce L., Michelis K.C., Nomura-Kitabayashi A., Pandey G., Purushothaman K.R., d'Escamard V., Li J.R., Hadri L., Fujitani K., Moreno P.R., Benard L., Rimmele P., Cohain A., Mecham B., Randolph G.J., Nabel E.G., Hajjar R., Fuster V., Boehm M., Kovacic J.C. Endothelial to mesenchymal transition is common in atherosclerotic lesions and is associated with plaque instability. *Nat Commun*. 2016;7:11853. doi: 10.1038/ncomms11853.

30. Yap C., Mieremet A., de Vries C.J.M., Micha D., de Waard V. Six Shades of Vascular Smooth Muscle Cells Illuminated by KLF4 (Krüppel-Like Factor 4). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021;41(11):2693-2707. doi: 10.1161/ATVBAHA.121.316600.

REFERENCES

1. Li Y., Lui K.O., Zhou B. Reassessing endothelial-to-mesenchymal transition in cardiovascular diseases. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(8):445-456. doi: 10.1038/s41569-018-0023-y.

2. Kovacic J.C., Dimmeler S., Harvey R.P., Finkel T., Aikawa E., Krenning G., Baker A.H. Endothelial to Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(2):190-209. doi: 10.1016/j.jacc.2018.09.089.

3. Chen P.Y., Schwartz M.A., Simons M. Endothelial-to-Mesenchymal Transition, Vascular Inflammation, and Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7:53. doi: 10.3389/fcvm.2020.00053.

4. Alvandi Z., Bischoff J. Endothelial-Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021;41(9):2357-2369. doi: 10.1161/ATVBAHA.121.313788.

5. Peng Q., Shan D., Cui K., Li K., Zhu B., Wu H., Wang B., Wong S., Norton V., Dong Y., Lu Y.W., Zhou C., Chen H. The Role of Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease. *Cells*. 2022;11(11):1834. doi: 10.3390/cells11111834.

6. Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Velikanova E.A., Sinitsky M.Y., Sinitskaya A.V., Markova V.E. Endothelial Dysfunction in the Context of Blood-Brain Barrier Modeling. *J Evol Biochem Physiol*. 2022;58(3):781-806. doi: 10.1134/S0022093022030139.

7. Kutikhin A.G., Tupikin A.E., Matveeva V.G., Shishkova D.K., Antonova L.V., Kabilov M.R., Velikanova E.A. Human Peripheral Blood-Derived Endothelial Colony-Forming Cells Are Highly Similar to Mature Vascular Endothelial Cells yet Demonstrate a Transitional Transcriptomic Signature. *Cells*. 2020;9(4):876. doi: 10.3390/cells9040876.

8. Khanova M.Yu., Velikanova E.A., Matveeva V.G., Krivkina E.O., Glushkova T.V., Sevostianova V.V., Kutikhin

A.G., Antonova L.V. Endothelial cell monolayer formation on a small-diameter vascular graft surface under pulsatile flow conditions. *Bulletin of Transplantation and Artificial Organs*. 2021;3(23):101-114. doi: 10.15825/1995-1191-2021-3-101-114.

9. Mukhamadiyarov R.A., Bogdanov L.A., Glushkova T.V., Shishkova D.K., Kostyunin A.E., Koshelev V.A., Shabaev A.R., Frolov A.V., Stasev A.N., Lyapin A.A., Kutikhin A.G. Embedding and Backscattered Scanning Electron Microscopy: A Detailed Protocol for the Whole-Specimen, High-Resolution Analysis of Cardiovascular Tissues. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:739549. doi: 10.3389/fcvm.2021.739549.

10. Ma J., Sanchez-Duffhues G., Goumans M.J., Ten Dijke P. TGF- β -Induced Endothelial to Mesenchymal Transition in Disease and Tissue Engineering. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:260. doi: 10.3389/fcell.2020.00260.

11. Ma J., van der Zon G., Gonçalves M.A.F.V., van Dinther M., Thorikay M., Sanchez-Duffhues G., Ten Dijke P. TGF- β -Induced Endothelial to Mesenchymal Transition Is Determined by a Balance Between SNAIL and ID Factors. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:616610. doi: 10.3389/fcell.2021.616610.

12. Ma J., van der Zon G., Sanchez-Duffhues G., Ten Dijke P. TGF- β -mediated Endothelial to Mesenchymal Transition (EndMT) and the Functional Assessment of EndMT Effectors using CRISPR/Cas9 Gene Editing. *J Vis Exp*. 2021;(168). doi: 10.3791/62198.

13. Krishnamoorthi M.K., Thandavarayan R.A., Youker K.A., Bhimaraj A. An In Vitro Platform to Study Reversible Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *Front Pharmacol*. 2022;13:912660. doi: 10.3389/fphar.2022.912660.

14. Tang R., Li Q., Lv L., Dai H., Zheng M., Ma K., Liu B. Angiotensin II mediates the high-glucose-induced endothelial-to-mesenchymal transition in human aortic endothelial cells. *Cardiovasc Diabetol*. 2010;9:31. doi: 10.1186/1475-2840-9-31

15. Nosedá M., McLean G., Niessen K., Chang L., Pollet I., Montpetit R., Shahidi R., Dorovini-Zis K., Li L., Beckstead B., Durand R.E., Hoodless P.A., Karsan A. Notch activation results in phenotypic and functional changes consistent with endothelial-to-mesenchymal transformation. *Circ Res.* 2004;94(7):910-7. doi: 10.1161/01.RES.0000124300.76171.C9.
16. Chang A.C., Fu Y., Garside V.C., Niessen K., Chang L., Fuller M., Setiadi A., Smrz J., Kyle A., Minchinton A., Marra M., Hoodless P.A., Karsan A. Notch initiates the endothelial-to-mesenchymal transition in the atrioventricular canal through autocrine activation of soluble guanylyl cyclase. *Dev Cell.* 2011;21(2):288-300. doi: 10.1016/j.devcel.2011.06.022.
17. Kostina A.S., Uspensky V.E., Irtyuga O.B., Ignatieva E.V., Freylikhman O., Gavriluk N.D., Moiseeva O.M., Zhuk S., Tomilin A., Kostareva A.A., Malashicheva A.B. Notch-dependent EMT is attenuated in patients with aortic aneurysm and bicuspid aortic valve. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1862(4):733-740. doi: 10.1016/j.bbdis.2016.02.006.
18. Xu X., Tan X., Tampe B., Sanchez E., Zeisberg M., Zeisberg E.M. Snail Is a Direct Target of Hypoxia-inducible Factor 1 α (HIF1 α) in Hypoxia-induced Endothelial to Mesenchymal Transition of Human Coronary Endothelial Cells. *J Biol Chem.* 2015;290(27):16653-64. doi: 10.1074/jbc.M115.636944.
19. Tang H., Babicheva A., McDermott K.M., Gu Y., Ayon R.J., Song S., Wang Z., Gupta A., Zhou T., Sun X., Dash S., Wang Z., Balistreri A., Zheng Q., Cordery A.G., Desai A.A., Rischard F., Khalpey Z., Wang J., Black S.M., Garcia J.G.N., Makino A., Yuan J.X. Endothelial HIF-2 α contributes to severe pulmonary hypertension due to endothelial-to-mesenchymal transition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2018;314(2):L256-L275. doi: 10.1152/ajplung.00096.2017.
20. Dejana E., Hirschi K.K., Simons M. The molecular basis of endothelial cell plasticity. *Nat Commun.* 2017;8:14361. doi: 10.1038/ncomms14361.
21. Piera-Velazquez S., Jimenez S.A. Endothelial to Mesenchymal Transition: Role in Physiology and in the Pathogenesis of Human Diseases. *Physiol Rev.* 2019;99(2):1281-1324. doi: 10.1152/physrev.00021.2018.
22. Gao Y., Galis Z.S. Exploring the Role of Endothelial Cell Resilience in Cardiovascular Health and Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(1):179-185. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314346.
23. Greenspan L.J., Weinstein B.M. To be or not to be: endothelial cell plasticity in development, repair, and disease. *Angiogenesis.* 2021;24(2):251-269. doi: 10.1007/s10456-020-09761-7.
24. Velikanova E.A., Kutikhin A.G., Matveeva V.G., Tupikin A.E., Kabilov M.R., Antonova L.V. Comparison of gene expression profiles of human peripheral blood derived endothelial colony-forming cells and coronary artery endothelial cells. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2020;9(2):74-81. doi: 10.17802/2306-1278-2020-9-2-74-81.
25. Niklason L., Dai G. Arterial Venous Differentiation for Vascular Bioengineering. *Annu Rev Biomed Eng.* 2018;20:431-447. doi: 10.1146/annurev-bioeng-062117-121231.
26. Wolf K., Hu H., Isaji T., Dardik A. Molecular identity of arteries, veins, and lymphatics. *J Vasc Surg.* 2019;69(1):253-262. doi: 10.1016/j.jvs.2018.06.195.
27. Marziano C., Genet G., Hirschi K.K. Vascular endothelial cell specification in health and disease. *Angiogenesis.* 2021;24(2):213-236. doi: 10.1007/s10456-021-09785-7.
28. Corbett A.H. Post-transcriptional regulation of gene expression and human disease. *Curr Opin Cell Biol.* 2018;52:96-104. doi: 10.1016/j.ceb.2018.02.011.
29. Evrard S.M., Lecce L., Michelis K.C., Nomura-Kitabayashi A., Pandey G., Purushothaman K.R., d'Escamard V., Li J.R., Hadri L., Fujitani K., Moreno P.R., Benard L., Rimmele P., Cohain A., Mecham B., Randolph G.J., Nabel E.G., Hajjar R., Fuster V., Boehm M., Kovacic J.C. Endothelial to mesenchymal transition is common in atherosclerotic lesions and is associated with plaque instability. *Nat Commun.* 2016;7:11853. doi: 10.1038/ncomms11853.
30. Yap C., Mieremet A., de Vries C.J.M., Micha D., de Waard V. Six Shades of Vascular Smooth Muscle Cells Illuminated by KLF4 (Krüppel-Like Factor 4). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(11):2693-2707. doi: 10.1161/ATVBAHA.121.316600.

Для цитирования: Шишкова Д.К., Синицкая А.В., Синицкий М.Ю., Матвеева В.Г., Великанова Е.А., Маркова В.Е., Кутихин А.Г. Случай спонтанного эндотелиально-мезенхимального перехода в культуре первичных эндотелиальных клеток пупочной вены человека. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2022;11(3): 97-114. DOI: 10.17802/2306-1278-2022-11-3-97-114

To cite: Shishkova D.K., Sinitskaya A.V., Sinitsky M.Yu., Matveeva V.G., Velikanova E.A., Markova V.E., Kutikhin A.G. Spontaneous endothelial-to-mesenchymal transition in human primary umbilical vein endothelial cells. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2022;11(3): 97-114. DOI: 10.17802/2306-1278-2022-11-3-97-114