



УДК 616-092

DOI 10.17802/2306-1278-2024-13-3-118-129

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕТОДОЛОГИИ ИЗУЧЕНИЯ НОРМАЛЬНОЙ И ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИОЛОГИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ

Д.К. Шишкова, А.В. Фролов, В.Е. Маркова, Ю.О. Маркова, А.И. Лазебная, А.Г. Кутихин

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», бульвар им. академика Л.С. Барбараша, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Основные положения

- Создание отечественного банка стандартизированных культур эндотелиальных клеток различных направлений дифференцировки (артериальной, венозной, микрососудистой, клапанной и лимфатической) и импортозамещенного технологического процесса для работы с ними является ключевой задачей для обеспечения возможности изучения физиологии эндотелия.
- Основная прикладная задача физиологии эндотелия включает культуральное и молекулярное обоснование выбора наилучшего источника аутологических эндотелиальных клеток с наиболее высоким регенеративным (в частности пролиферативным и ангиогенным) потенциалом.
- Методология исследования физиологии эндотелиальных клеток в нормальных и патологических условиях состоит из оценки их пролиферативных и ангиогенных свойств, а также анализа молекулярного профиля.

Резюме

Одной из основных целей изучения физиологии эндотелия является разработка биомедицинского клеточного продукта в виде аутологических эндотелиальных клеток с высоким регенеративным потенциалом для стимуляции ангиогенеза в ишемизированных тканях, а также для покрытия ими тканеинженерных конструкций (к примеру, сосудистых протезов) для их эндотелизации перед имплантацией в организм человека. В данном обзоре рассматриваются основные прикладные аспекты физиологии эндотелия, направленные на достижение данных целей, а именно: выбор источника эндотелиальных клеток для моделирования различных патологических процессов и регенеративной медицины, создание банка стандартизированных линий эндотелиальных клеток с различными направлениями дифференцировки для повышения эффективности данного моделирования, способы обеспечения адгезии, устойчивой пролиферации и физиологического функционирования первичных эндотелиальных клеток в культуре, а также методология оценки пролиферативной и ангиогенной активности в контексте анализа устойчивости эндотелиальных клеток к внешним воздействиям. В процессе обсуждения обосновывается необходимость сравнительного анализа регенеративных свойств микрососудистых эндотелиальных клеток из подкожной жировой ткани, колониеформирующих эндотелиальных клеток из периферической венозной крови и эндотелиальных клеток, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Отдельно рассматривается текущее состояние процесса импортозамещения различных компонентов технологий работы с эндотелиальными клетками (стандартизированных клеточных линий, функционального белкового покрытия и трехмерного матрикса для оценки ангиогенеза, питательных сред для выделения, культивирования и проведения экспериментов с эндотелиальными клетками, иных реагентов для выделения и субкультивирования эндотелиальных клеток, культуральной посуды, антител для проточно-цитометрического и флуоресцентно-микроскопического иммунофенотипирования). Анализируются перспективы импортозамещения недостающих звеньев работы: ряда линий эндотелиальных клеток, магнитных бус с иммобилизованными антителами для их выделения, конъюгированных с различными флуорофорами антител.

Ключевые слова

Эндотелиальные клетки • Пролiferация • Ангиогенез • Регенеративная медицина • Питательные среды • Иммунофенотипирование • Импортозамещение

Поступила в редакцию: 19.07.2024; поступила после доработки: 13.07.2024; принята к печати: 04.09.2024

Для корреспонденции: Дарья Кирилловна Шишкова, shishkovadk@gmail.com; адрес: бульвар им. академика Л.С. Барбараша, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Corresponding author: Daria K. Shishkova, shishkovadk@gmail.com; address: 6, academician Barbarash blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

IMPROVING METHODOLOGY OF ENDOTHELIAL CELL RESEARCH:
SYNOPSIS AND PROSPECTS

D.K. Shishkova, A.V. Frolov, V.E. Markova, Y.O. Markova, A.I. Lazebnaya, A.G. Kutikhin

Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", 6, academician Barbarash blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

Highlights

- The creation of a domestic bank of standardized endothelial cell cultures (arterial, venous, microvascular, valvular, and lymphatic lineages) and the development of an import-substituting technological process for working with them is a key task to enable next-generation endothelial physiology studies.
- The cultural and molecular justification for selecting the best source of autologous endothelial cells with the highest regenerative potential (in particular in context of their proliferative and angiogenic capacities) represents a primary task for endothelial physiology.
- The research methodology for studying endothelial cell physiology under normal and pathological conditions includes assessing their proliferative and angiogenic properties and molecular profiling.

Abstract

One of the primary goals in studying endothelial physiology is the development of a biomedical cell product in the form of autologous endothelial cells with high regenerative potential. These cells would be used to stimulate angiogenesis in ischemic tissues and to coat tissue-engineered constructs (such as vascular grafts) for their endothelialization prior to implantation into the human body. This review examines the key applied aspects of endothelial physiology aimed at achieving these objectives, including the selection of endothelial cell sources for modeling various pathological processes and regenerative medicine, the creation of a bank of standardized endothelial cell lines with various differentiation directions to enhance the effectiveness of this modeling, methods to ensure adhesion, sustained proliferation, and physiological functioning of primary endothelial cells in culture, as well as the methodology for assessing proliferative and angiogenic activity in the context of analyzing endothelial cell resistance to external influences. The discussion emphasizes the need for a comparative analysis of the regenerative properties of microvascular endothelial cells from subcutaneous adipose tissue, colony-forming endothelial cells from peripheral venous blood, and endothelial cells differentiated from induced pluripotent stem cells. Additionally, the current state of import substitution for various components of endothelial cell technology is reviewed, including standardized cell lines, functional protein coatings, and three-dimensional matrices for angiogenesis assessment, culture media for isolation, cultivation, and experimentation with endothelial cells, as well as other reagents for the isolation and subculturing of endothelial cells, culture dishes, and antibodies for flow cytometric and fluorescent microscopic immunophenotyping. The review also analyzes the prospects for import substitution of missing components, such as certain endothelial cell lines, magnetic beads with immobilized antibodies for their isolation, and antibodies conjugated with various fluorophores.

Keywords

Endothelial cells • Proliferation • Angiogenesis • Regenerative medicine • Cell culture medium • Immunophenotyping • Import substitution industrialization

Received: 19.07.2024; received in revised form: 13.07.2024; accepted: 04.09.2024

Изучение нормальной и патологической физиологии эндотелия: эндотелиальные клетки пупочной вены человека или подбор эндотелиальных линий в соответствии с направленно-стью экспериментов?

Моделирование физиологических или патологических процессов подразумевает воспроизведение или максимально возможное приближение к усло-

виям, наблюдаемым в организме человека. В лабораторной практике, однако, данный принцип соблюдается далеко не всегда в силу затруднительности получения различных компонентов модельных систем или возможности замещения более сложных компонентов их более простыми аналогами. В частности, при моделировании связанных с эндотелием процессов возникает вопрос о целесообразности

использования первичных артериальных, взрослых венозных и микрососудистых эндотелиальных клеток, для получения которых необходим интраоперационный или аутопсийный материал. В качестве примеров хирургических вмешательств для прижизненного выделения эндотелиальных клеток можно выделить коронарное шунтирование, в процессе которого становится возможным одновременное извлечение сегментов большой подкожной вены, внутренней грудной или лучевой артерий, а также фрагментов подкожной и эпикардиальной жировой ткани, содержащих большое количество микрососудов. Другими подходящими для этой цели хирургическими вмешательствами являются каротидная эндартерэктомия (в результате которой становится возможным получать сегменты сонных артерий), удаление варикозно расширенных вен (флебэктомия), а также протезирование аортального или митрального клапанов сердца. Тем не менее получаемый в результате данных хирургических вмешательств биоматериал естественным образом доступен исключительно для лабораторий, непосредственно находящихся в соответствующих медицинских центрах. Кроме того, при выполнении указанных операций не всегда удается получить достаточное для выделения эндотелиальных клеток количество биоматериала, так как в ряде случаев удается забрать лишь короткие сегменты сосудов или малое количество жировой ткани. Некоторые из приведенных оперативных вмешательств (каротидная эндартерэктомия, флебэктомия, протезирование клапанов сердца) по определению подразумевают удаление исключительно пораженных патологическим процессом сосудов, что лишает исследователей возможности выделения эндотелиальных клеток в их физиологическом состоянии. Следует отметить, что выделяемые из таких тканей линии эндотелиальных клеток (в частности, эндотелиальные клетки аортального клапана человека) активно используются в научных исследованиях и не имеют выраженных недостатков при культивировании в сравнении с эндотелиальными клетками, выделяемыми из относительно неизмененных сосудов (внутренняя грудная артерия, большая подкожная вена, сосуды микроциркуляторного русла подкожной или эпикардиальной жировой ткани).

В то же время подобных проблем лишено использование пупочной вены человека, которая выделяется из отсекаемой в процессе родов пуповины и по этой причине является относительно легкодоступным биоматериалом; кроме того, длины пуповины и пупочной вены достаточно для выделения значительного количества эндотелиальных клеток [1–3]. Протоколы выделения эндотелиальных клеток пупочной вены человека (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) детально описаны в литературе и обладают высокой стандартизиру-

емостью, что делает процесс менее зависимым от оператора и легко внедряемым в лаборатории вне зависимости от их специализации [1–3]. По этим причинам именно эндотелиальные клетки пупочной вены человека являются наиболее широко применяемой популяцией эндотелиальных клеток при исследованиях биоматериалов [4], болезней системы кровообращения [5] и в целом при изучении биологии эндотелия [6, 7]. Большинство российских лабораторий, занимающихся биологией эндотелия, также использует для своих экспериментов эндотелиальные клетки пупочной вены человека. Кроме того, фактическое отсутствие возможности поставок артериальных и микрососудистых эндотелиальных клеточных линий из-за рубежа в силу логистических сложностей временно замедлило их распространение в России.

Недостатки использования эндотелиальных клеток пупочной вены человека заключаются в первую очередь в несоответствии их физиологии таковой у клеток человека во взрослом возрасте (и тем более при различных патологических состояниях). В процессе жизни соматические клетки неминуемо накапливают геномные и эпигенетические модификации, о чем свидетельствуют доказанные различия молекулярного профиля гематопоетических клеток-предшественников [8], фибробластов [9] и эндотелиальных клеток [10, 11], при этом колониеформирующие эндотелиальные клетки различаются даже при выделении из периферической крови у доношенных и недоношенных младенцев [12]. При этом данные и подобные им работы весьма убедительно показывают, что эндотелиальные клетки, полученные от субъектов различного возраста, сохраняют определенные различия даже вне движения потока крови [10–12]. Степень глобальной молекулярной гетерогенности между неонатальными и взрослыми венозными эндотелиальными клетками и ее функциональные последствия остаются неясными. В силу фактического отсутствия возможности получения неонатальных и взрослых эндотелиальных клеток от одного и того же субъекта (особенно с учетом необходимости хранения неонатальных клеток на протяжении 50–60 лет), а также естественного отсутствия пупочной вены во взрослом возрасте их прямое и объективное сравнение достаточно затруднительно. Более реальной задачей представляется сравнение молекулярных профилей эндотелиальных клеток пупочной вены человека с эндотелиальными клетками большой подкожной вены пациентов, перенесших коронарное шунтирование. В таком сценарии используемый для шунтирования сегмент большой подкожной вены является относительно интактным (в отличие от аналогичных сегментов вен, получаемых при флебэктомии) и более сопоставимым с не пораженной никаким патологическим процессом

пупочной веной. Влияние межиндивидуальной вариабельности линий эндотелиальных клеток на результат в данном случае, однако, исключить возможным не представляется.

Методология такого исследования, как и в целом методология изучения гетерогенности эндотелиальных клеток, остается предметом активных дискуссий [13–18]. Полнотранскриптомное секвенирование с последующей верификацией методом количественной полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции является наиболее популярным методом изучения молекулярной гетерогенности эндотелия в силу сочетания технической возможности глобального анализа геной экспрессии, относительно высокой доступности и приемлемой стоимости. В то же время существенные различия между количеством и составом дифференциально экспрессируемых молекул в транскриптомных и протеомных исследованиях ограничивают реальную функциональную значимость анализа транскриптома (в том числе единичных клеток). Несмотря на очевидное преимущество полнотранскриптомного анализа для оценки молекулярной эволюции, мерой которой служит расстояние при анализе методом главных компонент и дискриминантном анализе, а также количество дифференциально экспрессированных генов, данный метод не позволяет в полной мере оценить патофизиологические последствия молекулярной гетерогенности эндотелия в силу слабой корреляции с данными масс-спектрометрического анализа, мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа на основе магнитных микросфер, дот-блот-профилирования классического иммуноблоттинга и иммуноферментного анализа. В отличие от полнотранскриптомного анализа все указанные методы анализа белков не позволяют в полной мере оценить молекулярную эволюцию вследствие ограниченной чувствительности (coverage), однако позволяют провести функциональный анализ последствий молекулярной гетерогенности. Ключевым преимуществом методом белкового анализа над транскриптомным в эндотелиальном контексте является возможность анализа клеточного секрета, поскольку большинство эффектов эндотелиальных клеток обусловлено молекулами, секретируемыми ими в микроокружение и системный кровоток. Вероятно, оптимальной методологией для сравнения физиологии венозных эндотелиальных клеток в неонатальном и взрослом возрасте является сочетание полнотранскриптомного и масс-спектрометрического анализа либо полнотранскриптомного анализа и мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа на основе магнитных микросфер либо дот-блот-профилирования.

В продолжение дискуссии о гетерогенности эндотелия *in vitro* следует сказать, что его объектив-

ное изучение затруднено вследствие: 1) сложности успешного выделения нескольких клеточных линий от одного и того же пациента; 2) различной эффективности такого выделения (количеством успешно выделенных на первом пассаже эндотелиальных клеток); 3) различной пролиферативной активности эндотелиальных клеток на первых пассажах (которая в первую очередь определяется долей эндотелиальных клеток с высоким прогениторным потенциалом в составе выделенных клеток); 4) различного соотношения эндотелиальных клеток и фибробластов (определяющего необходимость реселекции и количество ее повторов для очистки культуры); 5) рассинхронизации темпов клеточного старения вследствие различного количества изначально выделенных эндотелиальных клеток, количества раундов реселекции и делений, которые необходимо совершить эндотелиальным клеткам для достижения конfluence и наращивания необходимого количества клеток для проведения эксперимента. Указанные факторы в действительности являются артефактами выделения эндотелиальных клеток и не имеют отношения к их гетерогенности *in vivo* (в дополнение к естественным гемодинамическим различиям, сопровождающим жизнедеятельность различных эндотелиальных клеток). Кроме того, остается туманной степень изменений эндотелиальной физиологии в зависимости от количества совершенных эндотелиальными клетками делений или выполненных при их культивировании пассажей при отсутствии каких-либо внешних воздействий. Объективное исследование данного аспекта является возможным при помощи измерения геной экспрессии после трипсинизации клеток с их частичным лизисом для выделения РНК и частичным субкультивированием (пассированием или пересевом). Следует отметить, что и такой дизайн исследования не лишен недостатков: в частности, время трипсинизации и эффективность снятия эндотелиальных клеток с функционального белкового покрытия или культурального пластика неминуемо различается при различных пассажах независимо от их порядкового номера.

Следует подчеркнуть неопровержимость того факта, что гемодинамические параметры потока (ламинарный и турбулентный поток в различных сосудистых сегментах), газовый состав крови (артериальная, капиллярная, венозная) и иные метаболические аспекты (к примеру, различная насыщенность жирными кислотами в зависимости от сегмента сосудистого русла) *in vivo*, а также условия культивирования *in vitro* (статическое или динамическое, двух- или трехмерное культивирование, на культуральном пластике или на различных видах функционального белкового покрытия, в присутствии или отсутствие различных культуральных добавок) модулируют физиологию эндотелиаль-

ных клеток и определяют свойства конечного клеточного продукта. Остается неясным, существует ли некая безусловная гетерогенность различных типов эндотелиальных клеток независимо от внешних обстоятельств, а также техническая возможность ее определения.

Выходом из дилеммы между повсеместным использованием эндотелиальных клеток пупочной вены человека и индивидуальным подбором эндотелиальных клеточных линий в зависимости от проводимого эксперимента может стать создание в России банка стандартизированных линий эндотелиальных клеток, аналогичного таковым у крупных научно-производственных компаний (Cell Applications, PromoCell, Lonza Bioscience и др.). Наличие коллекции чистых линий различных артериальных, венозных, микрососудистых, клапанных и лимфатических эндотелиальных клеток (с чистотой от ≥ 98 до $\geq 99,5\%$) на относительно раннем пассаже (то есть с большим запасом клеточных делений до окончательной потери пролиферативной активности) могло бы удовлетворить экспериментальные потребности российских исследователей и привести *in vitro* моделирование физиологии и патофизиологии эндотелия к мировым стандартам. В частности, для изучения нормальной и патологической физиологии эндотелия (в том числе для моделирования паракринных взаимодействий эндотелиальных клеток с расположенными в непосредственной близости клеточными популяциями) депонированию в таком банке подлежат эндотелиальные клетки:

1) коронарной, сонной и бедренной артерий (для изучения атеросклероза соответствующих сосудистых бассейнов);

2) аорты (для изучения аортального атеросклероза и аневризм грудного и брюшного отделов);

3) легочной артерии (для исследования легочной артериальной гипертензии);

4) внутренней грудной артерии и большой подкожной вены (для исследования состояния относительно интактного эндотелия во взрослом возрасте перед коронарным шунтированием);

5) сосудов микроциркуляторного русла различного происхождения, наиболее легкодоступны из которых сосуды микроциркуляторного русла жировой ткани. Среди патофизиологически важных сосудов микроциркуляторного русла особенно важно выделить микрососуды сетчатки, поражаемые при диабетической ретинопатии, и микрососуды почек, поражаемые при диабетической нефропатии;

6) пупочной вены (по вышеуказанным причинам);

7) аортального и митрального клапанов сердца (для изучения приобретенных пороков сердца);

8) лимфатических сосудов (для изучения состояния эндотелия при инфекционных заболеваниях и злокачественных новообразованиях).

Выделение и культивирование первичных эндотелиальных клеток для создания коллекции стандартизированных культур: прикладные аспекты

Как уже отмечено, депонирование клеточных культур в вышеописанную коллекцию подразумевает их ранний пассаж (что в первую очередь определяется количеством и состоянием биоматериала для выделения) и ультравысокую ($\geq 99,5\%$) либо высокую ($\geq 98\%$) чистоту культуры для отсутствия влияния иных клеточных популяций (прежде всего фибробластов) на результат эксперимента. В процессе культивирования эндотелиальных клеток чистота этой культуры постепенно повышается при помощи их реселекции на магнитных бусинах, несущих антитела к одному из наиболее обильных эндотелиальных маркеров – CD31/PECAM1, что в конечном счете позволяет получать от некоторых доноров культуры ультравысокой чистоты. Иммунофенотипирование эндотелиальных клеток методом проточной цитометрии подразумевает использование антител к нескольким антигенам, в числе которых маркеры зрелых эндотелиальных клеток CD31/PECAM1 и CD146/MCAM, CD34 (маркер прогениторных клеток) и CD90 (маркер мезенхимальных клеток, доля экспрессии которого отражает количество фибробластов и клеток в состоянии эндотелиально-мезенхимального перехода). При такой комбинации антител клетки с положительной экспрессией CD31 и CD146 и отрицательной экспрессией CD90 (CD31⁺CD146⁺CD90⁻) имеют истинный эндотелиальный фенотип, клетки с положительной экспрессией всех указанных маркеров (CD31⁺CD146⁺CD90⁺) – фенотип эндотелиально-мезенхимального перехода, а клетки с отрицательной экспрессией CD31 и CD146 и положительной экспрессией CD90 (CD31⁻CD146⁻CD90⁺) – мезенхимальный фенотип. Экспрессия CD34 в данном контексте опциональна (поскольку данный маркер экспрессируется во многих клетках-предшественниках, а не только в эндотелиальных прогениторных клетках), однако ее определение позволяет провести ассоциативный или корреляционный анализ этого параметра с пролиферативной активностью культуры (оцененной при помощи колориметрических микропланшетных тестов с использованием водорастворимых солей тетразолия типа WST-8).

Помимо собственно эндотелиального фенотипа коллекционные культуры также должны обладать высокой пролиферативной активностью в течение длительного времени для получения достаточной для экспериментов клеточной массы. Как правило, эндотелиальные клетки культивируют на функциональном покрытии из желатина или фибронектина (с возможной сменой фибронектина непосред-

ственно после выделения эндотелиальных клеток на желатин для последующей пролиферации и наращивания клеточной массы), поскольку данные белки в большом количестве присутствуют в составе базальной мембраны, относительно легкодоступны для выделения и недороги в получении. Тем не менее существует потребность в исследовании молекулярного профиля эндотелиальных клеток, культивируемых и на более дорогих и менее доступных белковых покрытиях (ателоколлаген I типа из хвостовых сухожилий мыши и крысы либо сухожилий свиньи и быка, коллаген I типа из плаценты человека, коллаген IV типа из плаценты быка и человека, ламинин из плаценты быка и человека), а также на фибронектине из плазмы крови крысы, быка и человека в сравнении с желатином. Помимо собственно пролиферативной активности (определяемой посредством инкубации с водорастворимыми солями тетразолия или биоимпендансометрии) и визуальных характеристик культуры (детектируемых при помощи фазово-контрастной микроскопии или микроскопии в проходящем свете) представляется актуальным проводить анализ генной экспрессии с целью измерения экспрессии провоспалительных молекул (цитокинов и рецепторов клеточной адгезии) и транскрипционных факторов эндотелиально-мезенхимального перехода. Важно отметить, что данное исследование едва ли приведет к принципиальным изменениям в уже существующей культуральной практике, однако может повлиять на последовательность использования различных функциональных покрытий или на выбор источника происхождения того или иного белка базальной мембраны. Культуры клеток ультравысокой чистоты ($\geq 99,5\%$) в зависимости от обстоятельств также могут выращиваться на пластике, однако с целью имитации базальной мембраны все же предпочтительнее культивирование на покрытии, состоящем из основных белков базальной мембраны (желатина и фибронектина).

Ключевым фактором, определяющим скорость и стабильность культивирования эндотелиальных клеток, является питательная среда. В состав питательной среды для культивирования эндотелиальных клеток входит собственно основа (содержащая аминокислоты, витамины, неорганические соли и энергетические субстраты (в том числе глюкозу), фетальная бычья сыворотка, факторы роста, культуральные добавки (в частности пируват натрия и гидрокортизон), буферный раствор HEPES, антибиотики и антимикотик. При этом в зависимости от эксперимента концентрации указанных компонентов среды могут существенно варьировать для индукции эндотелиальной дифференцировки, обеспечения устойчивой и быстрой пролиферации или поддержания жизнеспособности в отсутствие сыворотки крови для последующего анализа клеточ-

ного секретома. В силу коммерческих наименований данных сред анализировать возможный дизайн исследования по сравнению их эффективности с позиции выбора экспериментальных групп представляется достаточно затруднительным. Методология такого исследования может быть достаточно схожей с применяемой при сравнительном анализе функциональных белковых покрытий (тест на интенсивность клеточной пролиферации и метаболизма с использованием водорастворимых солей тетразолия, биоимпендансометрия, динамический мониторинг по временным точкам при помощи фазово-контрастной микроскопии, анализ генной экспрессии).

Отдельно стоит рассмотреть проблемы выделения колониеформирующих эндотелиальных клеток из периферической венозной крови человека, которые потенциально являются одним из наиболее многообещающих источников эндотелиальных клеток для регенеративной медицины [19–24]. Успешность выделения данной клеточной популяции, которая в конечном счете приобретает классический эндотелиальный фенотип $CD31^+CD146^+CD90^-$ (с опциональной экспрессией белка CD34), определяется рядом факторов; к примеру, ранее было показано, что вероятность выделения данных клеток существенно повышается при выделении из крови, взятой интраоперационно в процессе чрескожного коронарного вмешательства или непосредственно после него [25]. Вероятно, причиной этому является сдувание эндотелиальных клеток в просвет кровеносного сосуда и, соответственно, их попадание в циркулирующий кровоток [25]. При выделении колониеформирующих эндотелиальных клеток из периферической венозной крови асимптоматичных субъектов успешность процедуры не превышает 25% (если говорить об итоговом получении культуры клеток высокой или ультравысокой чистоты с устойчивой и высокой пролиферативной активностью), что является недостаточным показателем и требует оптимизации компонентов питательной среды. Вероятно, решение этой проблемы представляет один из наиболее актуальных вызовов в разработке и серийном производстве питательных сред для культивирования эндотелиальных клеток.

Выбор оптимальной линии эндотелиальных клеток для регенеративной медицины: колониеформирующие эндотелиальные клетки, микрососудистые эндотелиальные клетки и эндотелиальные клетки, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Конечная цель исследования физиологии эндотелия заключается в создании биомедицинских клеточных продуктов для прямой цитотерапии и тканеинженерных медицинских изделий нового

поколения. Основной научно-производственной проблемой при достижении данной задачи является быстрое получение большого количества аутологичных эндотелиальных клеток, пригодных для непосредственного введения в организм пациента или к покрытию ими тканеинженерных конструкций [25, 26]. Сосудистые, клапанные или лимфатические эндотелиальные клетки, активно применяемые для изучения различных аспектов нормальной и патологической физиологии эндотелия, в подавляющем большинстве случаев не подходят для этой задачи в силу высокой инвазивности вмешательств, необходимых для извлечения сосудистых сегментов. Вероятно, единственным относительно доступным из сосудов для их получения является большая подкожная вена, однако ее удаление является травматичным вмешательством. Кроме того, несмотря на ограниченную эффективность венозных кондуитов для коронарного шунтирования в сравнении с артериальными, отсутствие коммерчески доступных клеточнозаселенных тканеинженерных сосудистых протезов с доказанной при коронарном шунтировании клинической эффективностью не позволяет проводить вмешательство, направленное на сознательный отказ от венозных кондуитов с большой доказательной базой. Активное развитие технологий клеточного, в том числе эндотелиального репрограммирования, пока что не привело к практическому результату, который бы мог быть транслирован в регенеративную медицину [27–30].

Тем не менее существуют два относительно легкодоступных источника для выделения клеточных популяций с большим регенеративным потенциалом: первым, наиболее доступным, является периферическая кровь, из которой возможно получать описанные выше колониеформирующие эндотелиальные клетки [31, 32], а также моно- и лимфоциты для их последующего репрограммирования в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), что ранее неоднократно успешно выполнено российскими учеными [33–36]. Вторым, менее доступным, является подкожная жировая ткань, из которой также возможно относительно малоинвазивно выделить различные клеточные популяции в результате липоаспирации, позволяющей получать большой объем биоматериала [37–40]. С учетом возможности получения периферической крови и подкожной жировой ткани у одного и того же субъекта сравнение регенеративного потенциала колониеформирующих эндотелиальных клеток из периферической венозной крови, дифференцированных из ИПСК эндотелиальных клеток и выделенных из подкожной жировой ткани эндотелиальных клеток представляет собой значительный интерес. При этом экстренное наращивание большой массы эндотелиальных клеток для клиниче-

ских нужд регенеративной медицины возможно исключительно в случае их предварительной дифференцировки из ИПСК либо в случае предварительного выделения из периферической крови или подкожной жировой ткани с последующим хранением. В отсутствие заранее сохраненных запасов аутологичных эндотелиальных клеток их быстрое наращивание теоретически возможно лишь при выделении большого количества подкожной жировой ткани или моноклеарной фракции крови, при этом как минимум первый и второй пассажи неизбежно будут достаточно долго достигать конfluence (в случае с колониеформирующими эндотелиальными клетками из периферической крови) или потребовать неоднократной реселекции (в случае с эндотелиальными клетками из подкожной жировой ткани). Дедифференцировка клеток моноклеарной фракции крови в ИПСК и получение из ИПСК эндотелиальных клеток являются длительными, затратными и сложными процессами (хотя наличие заранее готовых ИПСК частично решает эту проблему).

Обогащение популяций эндотелиальных клеток для регенеративной медицины в случае необходимости целесообразно осуществлять при помощи магнитной сепарации (на магнитных бусах с иммобилизованными антиген-специфичными антителами, к примеру антителами к CD31/PESAM1). Следует отметить, что применение биомедицинских клеточных продуктов (в том числе на основе эндотелиальных клеток) в обязательном порядке требует отсутствия продуктов животного происхождения в составе технологического процесса их культивирования (так называемый принцип xeno-free). Примерами изменения технологического процесса при реализации этого правила являются:

1. Отсутствие фетальной бычьей сыворотки в средах для поддержания пролиферации и мультипотентности, а также для направленной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток. В качестве альтернативы используются сыворотка крови человека, лизат тромбоцитов человека, надосадок, полученный из свежзамороженной плазмы крови человека, или искусственно воссозданный из рекомбинантных белков человека заменитель сыворотки крови. Вероятно, аналогичный подход должен быть справедлив и для использования биомедицинских клеточных продуктов на основе эндотелиальных клеток. При этом важно отметить, что тромбоцитарный фактор роста не входит в состав компонентов питательных сред для культивирования эндотелиальных клеток, следовательно, альтернативой фетальной бычьей сыворотке является сыворотка крови человека, полученный из свежзамороженной плазмы крови надосадок (криосупернатант) или искусственно воссозданный из рекомбинантных белков человека замени-

тель сыворотки крови. Последний является наиболее оптимальным вариантом (поскольку лишает технологический процесс производства продукта какой-либо гетерогенности по аналогии с *defined medium*), однако требует для своего создания поставленного производства рекомбинантных белков или их оптовых поставок для обеспечения рентабельности процесса изготовления биомедицинского клеточного продукта.

2. Отсутствие использования гипоталамического бычьего экстракта (добавляемого в эндотелиальные питательные среды первого поколения) и применение питательных сред с заранее известной концентрацией факторов роста и иных культуральных добавок, не содержащих бычьего гипоталамического экстракта (*defined medium*, второе поколение питательных сред для культивирования эндотелиальных клеток).

3. Человеческое происхождение функционального белкового покрытия, вследствие чего наиболее подходящим его вариантом при производстве биомедицинских клеточных продуктов является фибронектин из плазмы крови человека.

4. Замена трипсина (получаемого из поджелудочной железы быка или свиньи) на ферменты беспозвоночных или растительного происхождения для диссоциации тканей и клеток, протеолиза и коллагенолиза, а также ингибирование данных ферментов при помощи вышеупомянутого искусственного заменителя сыворотки крови, ингибитора трипсина из плодов сои или сочетания специализированных ингибиторов.

Соблюдение принципов *xeno-free* и *defined* по отношению к питательным средам, функциональному белковому покрытию, сыворотке крови (либо к различным ее заменителям), а также диссоциативно-протеолитическому раствору и его ингибиторам в известной степени повышает стоимость производства стандартизированных биомедицинских клеточных продуктов в сравнении со стандартным технологическим процессом, принятым в научно-исследовательской практике.

Методология сравнительной оценки регенеративного потенциала указанных клеточных популяций в первую очередь должна включать оценку их пролиферативной, миграционной и ангиогенной активности, поскольку наиболее важной причиной использования аутологичных эндотелиальных клеточных популяций в качестве биомедицинских клеточных продуктов является восстановление кровотока в ишемизированных тканях. Вероятно, наиболее подходящим тестом для комбинированной оценки пролиферативной и миграционной активности является *scratch assay*, при котором посередине конфлюэнтной эндотелиальной культуры при помощи специального разреза в крышке культурального планшета и соответствующего скребка создается

геометрически правильный дефект, который далее заполняется эндотелиальными клетками [41]. Основным оцениваемым параметром при этом является скорость заполнения дефекта эндотелиальными клетками. Ангиогенная активность эндотелиальных клеток классически оценивается по их способности формировать капилляроподобные структуры в трехмерном матриксе, состоящем из основных белков базальной мембраны: ламинина, коллагена IV типа, энтактина и перлекана [42, 43]. Кроме того, при оценке регенеративного потенциала эндотелиальных клеток принципиальным моментом является их устойчивость к внешним воздействиям, в частности к различным пусковым факторам дисфункции эндотелия [44, 45]. Иными словами, для обеспечения надлежащей пролиферации и ангиогенеза эндотелиальные клетки должны обладать высокой устойчивостью к повышенным концентрациям основных триггеров, связанным с коморбидными состояниями: глюкозы крови (сахарный диабет), жирных кислот (избыточная масса тела и ожирение), мочевины и кальципротеиновых частиц (острое повреждение или хроническая болезнь почек). Сохранение высокой пролиферативной, миграционной и ангиогенной активности при воздействии указанных триггеров является одной из ключевых характеристик эндотелиальных клеточных популяций, применяемых в регенеративной медицине [46–48].

Технологии работы с эндотелиальными клетками: обзор текущего состояния товарной номенклатуры и перспективы ее импортозамещения

В свете текущих геополитических и макроэкономических обстоятельств следует отметить высокую степень импортозамещения технологий работы с эндотелиальными клетками, а также высокий потенциал к импортозамещению проблемных технологических звеньев. В этом контексте можно выделить следующие компоненты:

1. Собственно стандартизированные и прошедшие пролиферативный и проточно-цитометрический контроль качества культуры эндотелиальных клеток (в частности указанные выше при описании соответствующей коллекции). В настоящее время в российских лабораториях отработаны технологии собственного получения всех типов эндотелиальных клеток (артериальных, венозных, микрососудистых, клапанных и лимфатических), и вопрос выделения линий для каждого конкретного сосуда ограничен исключительно потребностями и временем (проблема заключается скорее в отсутствии единой верифицированной и стандартизированной коллекции эндотелиальных клеток, чем в технологических проблемах их получения).

2. Функциональное белковое покрытие для

устойчивой адгезии эндотелиальных клеток (фибронектин, желатин, коллаген и другие белки базальной мембраны). Данный компонент можно отнести к успешно импортозамещенным; в настоящее время на российском рынке представлен широкий спектр таких белков от различных биологических видов (производство ООО «Имтек»), что позволяет в случае необходимости оптимизировать их выбор под конкретные линии эндотелиальных клеток. К этой же категории товарной номенклатуры можно условно отнести и трехмерный матрикс для оценки способности эндотелиальных клеток формировать капилляроподобные структуры, производимый в КНР и доступный к приобретению на российском рынке.

3. Питательные среды для культивирования и проведения экспериментов с эндотелиальными клетками (в частности для анализа изменения их пролиферативных, миграционных, метаболических и ангиогенных свойств, а также для оценки их жизнеспособности и барьерной функции при различных внешних воздействиях). Этот компонент также является успешно импортозамещенным (компания AppScience Products). Так, к коммерческому приобретению в России доступны соответствующие питательные среды в различных вариациях: 1) стандартная среда с фетальной бычьей сывороткой, факторами роста, культуральными добавками, буферным раствором, антибиотиками и антимикотиком (для обеспечения устойчивой пролиферации эндотелиальных клеток); 2) аналогичная среда в бессывороточном варианте (для поддержания физиологического состояния эндотелиальных клеток при проведении экспериментов); 3) аналогичная среда с увеличенным содержанием фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) в сывороточном (для выделения, запуска пролиферации и ускоренного культивирования первичных эндотелиальных клеток) и бессывороточном (для поддержания физиологического состояния эндотелиальных клеток при проведении экспериментов) варианте; 4) аналогичная среда без VEGF в сывороточном варианте (для поддержания барьерной функции эндотелиальных клеток). Следует подчеркнуть важность индивидуального подбора питательной среды в зависимости от цели эксперимента, поскольку анализ различных функций эндотелиальных клеток подразумевает различное содержание VEGF – основного фактора, обеспечивающего пролиферацию эндотелиальных клеток, проницаемость эндотелиального монослоя и ангиогенез [49, 50]. Кроме того, в настоящее время также ведется разработка питательной среды для стабильного запуска эндотелиальной дифференцировки и стимуляции ангиогенеза в *in vivo* эксплантах с повышенным содержанием сразу нескольких факторов роста.

4. Реагенты для выделения и субкультивирова-

ния (пассирования или пересева) эндотелиальных клеток, которые в большинстве своем производятся ООО НПП «Панэко» и ООО «Биолот». Исключение составляют микро- или наноразмерные магнитные бусы с иммобилизованным на них антителом к CD31/PECAM1, которые поставляются исключительно западными производителями. Тем не менее проводимые на момент написания статьи научно-исследовательские и опытно-конструкторские работы (НИОКР) также позволяют надеяться на разработку аналогичного продукта российского производства (AppScience Products).

5. Культуральная посуда и криопротекторы (в частности диметилсульфоксид высокой чистоты), в широком ассортименте производимые в КНР. Помимо стандартных разновидностей чашек Петри, культуральных планшетов и флаконов следует также выделить культуральные планшеты, оснащенные дополнительными крышками с удлиненными отверстиями и соответствующими скребками для создания правильного дефекта.

6. Антитела для проточно-цитометрического и флюоресцентно-микроскопического иммунофенотипирования эндотелиальных клеток, которые также производятся в КНР и заранее конъюгированы с широким спектром флюорофоров. Определенные перспективы получения таких антител есть и в России (AppScience Products), однако данный продукт все еще находится на стадии НИОКР.

Таким образом, степень импортозамещенности стандартных технологий работы с эндотелиальными клетками позволяет говорить о возможности непрерывной научно-исследовательской работы в этом направлении. Отдельным пунктом следует выделить компоненты технологии получения и направленной эндотелиальной дифференцировки ИПСК (в частности питательные среды), которые также имеют высокий потенциал к импортозамещению, однако в силу относительно высокой сложности самого технологического процесса и необходимости его калибровки с помощью стандартных компонентов данная НИОКР может занять длительное время. Тем не менее высокий регенеративный потенциал ИПСК и возможность их дифференцировки в различных направлениях (не только в эндотелиальном) диктуют необходимость локализации производства основных компонентов данной технологии в России и апробации соответствующего технологического процесса с их использованием.

Конфликт интересов

Д.К. Шишкова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.В. Фролов заявляет об отсутствии конфликта интересов. В.Е. Маркова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Ю.О. Маркова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.И. Лазебная заявляет об отсутствии конфликта

интересов. А.Г. Кутихин входит в редакционную коллегию журнала «Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний».

Финансирование

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2024-0001 «Разработка новых фармакологических подходов к экспериментальной терапии атеросклероза, технологий серийного про-

изводства реактивов и расходных материалов для изучения физиологии и патофизиологии сердечно-сосудистой системы и программного обеспечения на основе искусственного интеллекта для автоматизированной диагностики патологий системы кровообращения и автоматизированного расчета сердечно-сосудистого риска» и 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 заведующая лабораторией молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1518-3888

Фролов Алексей Витальевич, доктор медицинских наук старший научный сотрудник лаборатории рентгенэндоваскулярной и реконструктивной хирургии сердца и сосудов отдела хирургии сердца и сосудов федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1746-8895

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

Маркова Юлия Олеговна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0009-0007-6734-3787

Лазебная Анастасия Ивановна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1867-6354

Кутихин Антон Геннадьевич, доктор медицинских наук заведующий отделом экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

Вклад авторов в статью

ШДК – интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ФАВ – интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Information Form

Shishkova Daria K., PhD, Head of the Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1518-3888

Frolov Alexey V., MD, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Endovascular and Reconstructive Cardiovascular Surgery, Department of Cardiovascular Surgery, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1746-8895

Markova Victoria E., Junior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-6652-5745

Markova Yulia O., Junior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0009-0007-6734-3787

Lazebnaya Anastasia I., Junior Researcher, Laboratory for Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1867-6354

Kutikhin Anton G., MD, PhD, Head of the Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

Author Contribution Statement

ShDK – data interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

FAV – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

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

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

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

КАГ – интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

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

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

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

KAG – data interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Crampton S.P., Davis J., Hughes C.C. Isolation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *J Vis Exp*. 2007;(3):183. doi: 10.3791/183.
2. Lei J., Peng S., Samuel S.B., Zhang S., Wu Y., Wang P., Li Y.F., Liu H. A simple and biosafe method for isolation of human umbilical vein endothelial cells. *Anal Biochem*. 2016;508:15-8. doi: 10.1016/j.ab.2016.06.018.
3. Chandel S., Kumaragurubaran R., Giri H., Dixit M. Isolation and Culture of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). *Methods Mol Biol*. 2024;2711:147-162. doi: 10.1007/978-1-0716-3429-5_12.
4. Hauser S., Jung F., Pietzsch J. Human Endothelial Cell Models in Biomaterial Research. *Trends Biotechnol*. 2017;35(3):265-277. doi: 10.1016/j.tibtech.2016.09.007.
5. Medina-Leyte D.J., Domínguez-Pérez M., Mercado I., Villarreal-Molina M.T., Jacobo-Albavera L. Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) as a Model to Study Cardiovascular Disease: A Review. *Appl Sci*. 2020;10(3):938. doi: 10.3390/app10030938.
6. Dienemann S., Schmidt V., Fleischhammer T., Mueller J.H., Lavrentieva A. Comparative analysis of hypoxic response of human microvascular and umbilical vein endothelial cells in 2D and 3D cell culture systems. *J Cell Physiol*. 2023;238(5):1111-1120. doi: 10.1002/jcp.31002.
7. Lau S., Gossen M., Lendlein A., Jung F. Venous and Arterial Endothelial Cells from Human Umbilical Cords: Potential Cell Sources for Cardiovascular Research. *Int J Mol Sci*. 2021;22(2):978. doi: 10.3390/ijms22020978.
8. Mayani H. Biological differences between neonatal and adult human hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2010;19(3):285-98. doi: 10.1089/scd.2009.0327.
9. Sun H., Pratt R.E., Dzau V.J., Hodgkinson C.P. Neonatal and adult cardiac fibroblasts exhibit inherent differences in cardiac regenerative capacity. *J Biol Chem*. 2023;299(5):104694. doi: 10.1016/j.jbc.2023.104694.
10. Legros H., Launay S., Roussel B.D., Marcou-Labarre A., Calbo S., Catteau J., Leroux P., Boyer O., Ali C., Marret S., Vivien D., Laudenbach V. Newborn- and adult-derived brain microvascular endothelial cells show age-related differences in phenotype and glutamate-evoked protease release. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29(6):1146-58. doi: 10.1038/jcbfm.2009.39.
11. Robertson J.O., Erzurum S.C., Asosingh K. Pathological Roles for Endothelial Colony-Forming Cells in Neonatal and Adult Lung Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2023;68(1):13-22. doi: 10.1165/rcmb.2022-0318PS.
12. Bertagnolli M., Xie L.F., Paquette K., He Y., Cloutier A., Fernandes R.O., Béland C., Sutherland M.R., Delfrate J., Curnier D., Bigras J.L., Rivard A., Thibaud B., Luu T.M., Nuyt A.M. Endothelial Colony-Forming Cells in Young Adults Born Preterm: A Novel Link Between Neonatal Complications and Adult Risks for Cardiovascular Disease. *J Am Heart Assoc*. 2018;7(14):e009720. doi: 10.1161/JAHA.118.009720.
13. McAleese C. Insights into endothelial metabolic heterogeneity. *Nat Rev Cardiol*. 2024 Jun 5. doi: 10.1038/s41569-024-01049-3. Online ahead of print.
14. Trimm E., Red-Horse K. Vascular endothelial cell development and diversity. *Nat Rev Cardiol*. 2023;20(3):197-210. doi: 10.1038/s41569-022-00770-1.
15. Jung R., Trivedi C.M. Unveiling the Spatiotemporal Diversity of the Endothelium in Development: A Multi-Omics Approach. *Circ Res*. 2024;134(5):547-549. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.124.324328.
16. Chen J., Zhang X., DeLaughter D.M., Trembley M.A., Saifee S., Xiao F., Chen J., Zhou P., Seidman C.E., Seidman J.G., Pu W.T. Molecular and Spatial Signatures of Mouse Embryonic Endothelial Cells at Single-Cell Resolution. *Circ Res*. 2024;134(5):529-546. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.123.323956.
17. Becker L.M., Chen S.H., Rodor J., de Rooij L.P.M.H., Baker A.H., Carmeliet P. Deciphering endothelial heterogeneity in health and disease at single-cell resolution: progress and perspectives. *Cardiovasc Res*. 2023;119(1):6-27. doi: 10.1093/cvr/cvac018.
18. Liu Z., Ruter D.L., Quigley K., Tanke N.T., Jiang Y., Bautch V.L. Single-Cell RNA Sequencing Reveals Endothelial Cell Transcriptome Heterogeneity Under Homeostatic Laminar Flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021;41(10):2575-2584. doi: 10.1161/ATVBAHA.121.316797.
19. Salybekov A.A., Kobayashi S., Asahara T. Characterization of Endothelial Progenitor Cell: Past, Present, and Future. *Int J Mol Sci*. 2022;23(14):7697. doi: 10.3390/ijms23147697.
20. Zhang Q., Cannavici A., Kutryk M.J.B. Exploring Endothelial Colony-Forming Cells to Better Understand the Pathophysiology of Disease: An Updated Review. *Stem Cells Int*. 2022;2022:4460041. doi: 10.1155/2022/4460041.
21. Chambers S.E.J., Pathak V., Pedrini E., Soret L., Gendron N., Guerin C.L., Stitt A.W., Smadja D.M., Medina R.J. Current concepts on endothelial stem cells definition, location, and markers. *Stem Cells Transl Med*. 2021;10 (Suppl 2):S54-S61. doi: 10.1002/sctm.21-0022.
22. Dight J., Zhao J., Styke C., Khosrotehrani K., Patel J. Resident vascular endothelial progenitor definition and function: the age of reckoning. *Angiogenesis*. 2022;25(1):15-33. doi: 10.1007/s10456-021-09817-2.
23. Kutikhin A.G., Sinitsky M.Y., Yuzhalin A.E., Velikanova E.A. Shear stress: An essential driver of endothelial progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2018;118:46-69. doi: 10.1016/j.jmcc.2018.03.007.
24. Liao G., Zheng K., Shorr R., Allan D.S. Human endothelial colony-forming cells in regenerative therapy: A systematic review of controlled preclinical animal studies. *Stem Cells Transl Med*. 2020;9(11):1344-1352. doi: 10.1002/sctm.20-0141.
25. Deng D., Zhang Y., Tang B., Zhang Z. Sources and applications of endothelial seed cells: a review. *Stem Cell Res Ther*. 2024;15(1):175. doi: 10.1186/s13287-024-03773-6.
26. Nguyen H.T., Peirsman A., Tirpakova Z., Mandal K., Vanlauwe F., Maity S., Kawakita S., Khorsandi D., Herculano R., Umemura C., Yilgor C., Bell R., Hanson A., Li S., Nanda

- H.S., Zhu Y., Najafabadi A.H., Jucaud V., Barros N., Dokmeci M.R., Khademhosseini A. Engineered Vasculature for Cancer Research and Regenerative Medicine. *Micromachines* (Basel). 2023;14(5):978. doi: 10.3390/mi14050978.
27. Wingo M., Rafii S. Endothelial reprogramming for vascular regeneration: Past milestones and future directions. *Semin Cell Dev Biol.* 2022;122:50-55. doi: 10.1016/j.semcdb.2021.09.003.
28. Cho S., Aakash P., Lee S., Yoon Y.S. Endothelial cell direct reprogramming: Past, present, and future. *J Mol Cell Cardiol.* 2023;180:22-32. doi: 10.1016/j.yjmcc.2023.04.006.
29. Loh K.M., Ang L.T. Building human artery and vein endothelial cells from pluripotent stem cells, and enduring mysteries surrounding arteriovenous development. *Semin Cell Dev Biol.* 2024;155(Pt C):62-75. doi: 10.1016/j.semcdb.2023.06.004.
30. Florido M.H.C., Ziats N.P. Endothelial dysfunction and cardiovascular diseases: The role of human induced pluripotent stem cells and tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 2024;112(8):1286-1304. doi: 10.1002/jbm.a.37669.
31. 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. doi: 10.3390/ijms19113453.
32. 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.
33. Malakhova A.A., Grigor'eva E.V., Pavlova S.V., Malankhanova T.B., Valetdinova K.R., Vyatkin Y.V., Khabarova E.A., Rzaev J.A., Zakian S.M., Medvedev S.P. Generation of induced pluripotent stem cell lines ICGi021-A and ICGi022-A from peripheral blood mononuclear cells of two healthy individuals from Siberian population. *Stem Cell Res.* 2020;48:101952. doi: 10.1016/j.scr.2020.101952.
34. Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Tmoyan N.A., Elisaphenko E.A., Zubkova E.S., Sleptcov A.A., Nazarenko M.S., Ezhov M.V., Kukharchuk V.V., Parfyonova Y.V., Zakian S.M. Induced pluripotent stem cell line ICGi036-A generated by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with familial hypercholesterolemia caused due to compound heterozygous p.Ser177Leu/p.Cys352Arg mutations in LDLR. *Stem Cell Res.* 2022;59:102653. doi: 10.1016/j.scr.2022.102653.
35. Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Tmoyan N.A., Elisaphenko E.A., Zubkova E.S., Sleptcov A.A., Nazarenko M.S., Ezhov M.V., Kukharchuk V.V., Parfyonova Y.V., Zakian S.M. Induced pluripotent stem cell line ICGi038-A, obtained by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with familial hypercholesterolemia due to compound heterozygous c.1246C > T/c.940 + 3_940 + 6del mutations in LDLR. *Stem Cell Res.* 2022;60:102702. doi: 10.1016/j.scr.2022.102702.
36. Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Tmoyan N.A., Elisaphenko E.A., Kalinin A.P., Sleptcov A.A., Nazarenko M.S., Ezhov M.V., Kukharchuk V.V., Parfyonova Y.V., Zakian S.M. Induced pluripotent stem cell line ICGi037-A, obtained by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with familial hypercholesterolemia due to heterozygous p.Trp443Arg mutations in LDLR. *Stem Cell Res.* 2022;60:102703. doi: 10.1016/j.scr.2022.102703.
37. Gimble J.M., Ray S.P., Zanata F., Wu X., Wade J., Khoobehi K., Ferreira L.M., Bunnell B.A. Adipose Derived Cells and Tissues for Regenerative Medicine. *ACS Biomater Sci Eng.* 2017;3(8):1477-1482. doi: 10.1021/acsbomaterials.6b00261.
38. Laschke M.W., Seifert M.S., Scheuer C., Kontaxi E., Metzger W., Menger M.D. High glucose exposure promotes proliferation and in vivo network formation of adipose-tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater.* 2019;38:188-200. doi: 10.22203/eCM.v038a13.
39. Antonyshyn J.A., Mazzoli V., McFadden M.J., Gramolini A.O., Hofer S.O.P., Simmons C.A., Santerre P.J. Immunomagnetic Isolation and Enrichment of Microvascular Endothelial Cells from Human Adipose Tissue. *Bio Protoc.* 2022;12(10):e4422. doi: 10.21769/BioProtoc.4422.
40. Antonyshyn J.A., MacQuarrie K.D., McFadden M.J., Gramolini A.O., Hofer S.O.P., Santerre J.P. Paracrine cross-talk between human adipose tissue-derived endothelial cells and perivascular cells accelerates the endothelialization of an electrospun ionomeric polyurethane scaffold. *Acta Biomater.* 2024;175:214-225. doi: 10.1016/j.actbio.2023.12.037.
41. Jonkman J.E., Cathcart J.A., Xu F., Bartolini M.E., Amon J.E., Stevens K.M., Colarusso P. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adh Migr.* 2014;8(5):440-51. doi: 10.4161/cam.36224.
42. Aisenbrey E.A., Murphy W.L. Synthetic alternatives to Matrigel. *Nat Rev Mater.* 2020;5(7):539-551. doi: 10.1038/s41578-020-0199-8.
43. Passaniti A., Kleinman H.K., Martin G.R. Matrigel: history/background, uses, and future applications. *J Cell Commun Signal.* 2022;16(4):621-626. doi: 10.1007/s12079-021-00643-1.
44. 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.
45. Tombor L.S., Dimmeler S. Why is endothelial resilience key to maintain cardiac health? *Basic Res Cardiol.* 2022;117(1):35. doi: 10.1007/s00395-022-00941-8.
46. Mühleder S., Fernández-Chacón M., Garcia-Gonzalez I., Benedito R. Endothelial sprouting, proliferation, or senescence: tipping the balance from physiology to pathology. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(4):1329-1354. doi: 10.1007/s00018-020-03664-y.
47. Jerka D., Bonowicz K., Piekarska K., Gokyer S., Derici U.S., Hindy O.A., Altunay B.B., Yazgan I., Steinbrink K., Kleszczyński K., Yilgor P., Gagat M. Unraveling Endothelial Cell Migration: Insights into Fundamental Forces, Inflammation, Biomaterial Applications, and Tissue Regeneration Strategies. *ACS Appl Bio Mater.* 2024;7(4):2054-2069. doi: 10.1021/acsabm.3c01227.
48. Qiu J., Hirschi K.K. Endothelial Cell Development and Its Application to Regenerative Medicine. *Circ Res.* 2019;125(4):489-501. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.311405.
49. Pérez-Gutiérrez L., Ferrara N. Biology and therapeutic targeting of vascular endothelial growth factor A. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2023;24(11):816-834. doi: 10.1038/s41580-023-00631-w.
50. Simons M., Gordon E., Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(10):611-25. doi: 10.1038/nrm.2016.87.

Для цитирования: Шишкова Д.К., Фролов А.В., Маркова В.Е., Маркова Ю.О., Лазебная А.И., Кутихин А.Г. Актуальные проблемы методологии изучения нормальной и патологической физиологии эндотелиальных клеток в культуре. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2024;13(3): 118-129. DOI: 10.17802/2306-1278-2024-13-3-118-129

To cite: Shishkova D.K., Frolov A.V., Markova V.E., Markova Y.O., Lazebnaya A.I., Kutikhin A.G. Improving methodology of endothelial cell research: synopsis and prospects. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2024;13(3): 118-129. DOI: 10.17802/2306-1278-2024-13-3-118-129