

УДК 616-092.6

DOI 10.17802/2306-1278-2025-14-4-196-215

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА, ВНУТРЕННЕЙ ГРУДНОЙ АРТЕРИИ, БОЛЬШОЙ ПОДКОЖНОЙ ВЕНЫ И МИКРОСОСУДОВ ПОДКОЖНОЙ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА

В.Е. Маркова¹, Д.К. Шишкова¹, А.В. Фролов¹, Л.С. Басович², М.Ю. Синицкий¹,
А.В. Синицкая¹, Ю.О. Юрьева¹, А.И. Лазебная¹, А.Г. Кутихин¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», бульвар им. академика Л.С. Барбараша, стр. 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002; ² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, Тихорецкий проспект, 4, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194064

Основные положения

- В число цитокинов, выделяемых при культивировании первичными эндотелиальными клетками клапанов сердца, артерий, вен и сосудов микроциркуляторного русла человека, входят MIF, IL-6, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, MIP-3 α /CCL20, GM-CSF, G-CSF, GRO- α /CXCL1, ENA-78/CXCL5, IP-10/CXCL10, PTX3.
- Вышеперечисленные цитокины можно разделить на высокоэкспрессируемые (MCP-1/CCL2, IL-8/CXCL8, GRO α /CXCL1, MIF, пентраксин-3), среднеэкспрессируемые (IL-6) и низкоэкспрессируемые (GM-CSF, G-CSF, RANTES/CCL5, MIP-3 α /CCL20, ENA-78/CXCL5, IP-10/CXCL10).
- Эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии человека характеризуются наиболее интенсивным синтезом и наиболее выраженным выделением провоспалительных цитокинов в сравнении с эндотелиальными клетками вен, сосудов микроциркуляторного русла и клапанов сердца.

Цель

Определить перечень провоспалительных цитокинов, выделяемых различными линиями первичных эндотелиальных клеток в культуральную среду.

Материалы и методы

Первичные эндотелиальные клетки аортального клапана (ЭК-АК) были получены от пациентов с аортальным стенозом (n = 3). Первичные эндотелиальные клетки большой подкожной вены (n = 3), внутренней грудной артерии (n = 3) и сосудов микроциркуляторного русла подкожной жировой ткани (n = 3) были выделены от пациентов с ишемической болезнью сердца, подвергшихся коронарному шунтированию. Анализ экспрессии генов *MIF*, *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL1*, *CXCL5*, *CXCL10*, *PTX3*, *SERPINE1*, *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE* и *SELP* был проведен методом количественной полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции. Анализ содержания 109 провоспалительных цитокинов в бессывороточной культуральной среде был выполнен посредством полуколичественного дот-блот-профилирования с хемилюминесцентной схемой детекции и последующей денситометрией в программе ImageJ. Статистический анализ проводили при помощи критерия Краскела-Уоллиса с поправкой на множественные сравнения по критерию Данна.

Результаты

MIF, IL-6, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, GM-CSF, GRO α /CXCL1, ENA-78/CXCL5 и PTX3 были детектированы в культуральной среде от всех выделенных линий ЭК, а G-CSF, MIP-3 α /CCL20 и IP-10/CXCL10 – только в культуральной среде от ЭК-ВГА. В сравнении с остальными изученными линиями ЭК-ВГА характеризовались статистически значимо повышенной экспрессией генов *CCL2*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3* и *CXCL10*, а также тенденцией к значимому повышению экспрессии генов *CXCL5* и *SERPINE1*. Напротив, в ЭК-БПВ и МСЭК не было выявлено тенденции к значимому повышению экспрессии хотя бы одного гена провоспалительных цитокинов. Шесть приведенных генов (*CCL2*, *CXCL8*, *CXCL1*, *MIF*, *PTX3*, *IL6*) стабильно обладали более высокой экспрессией в сравнении с остальными генами цитокинов независимо от клеточной линии. Подсчет суммы рангов экспрессии каждого из исследованных цитокинов показал существенное различие ее значений между ЭК-ВГА и остальными линиями ЭК.

Для корреспонденции: Виктория Евгеньевна Маркова, marvika97@gmail.com; адрес: бульвар им. академика Л.С. Барбараша, стр. 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Corresponding author: Victoria E. Markova, marvika97@gmail.com; address: 6, academician Barbarash blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

Заключение	Полученные данные позволили определить перечень выделяемых ЭК провоспалительных цитокинов (MIF, IL-6, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, MIP-3 α /CCL20, GM-CSF, G-CSF, GRO- α /CXCL1, ENA-78/CXCL5, IP-10/CXCL10, PTX3) и предположить более выраженный провоспалительный статус ЭК-ВГА в сравнении с ЭК-АК, ЭК-БПВ и МСЭК.
Ключевые слова	Эндотелиальные клетки • Аортальный клапан • Внутренняя грудная артерия • Большая подкожная вена • Сосуды микроциркуляторного русла • Провоспалительные цитокины • Дисфункция эндотелия

Поступила в редакцию: 19.06.2025; поступила после доработки: 14.07.2025; принята к печати: 08.08.2025

SYNTHESIS OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES BY HUMAN AORTIC VALVE, INTERNAL THORACIC ARTERY, SAPHENOUS VEIN, AND ADIPOSE TISSUE-DERIVED MICROVASCULAR ENDOTHELIAL CELLS

V.E. Markova¹, D.K. Shishkova¹, A.V. Frolov¹, L.S. Basovich², M.Yu. Sinitsky¹,
A.V. Sinitskaya¹, Yu.O. Yurieva¹, A.I. Lazebnaya¹, A.G. Kutikhin¹

¹ Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, 6, academician Barbarash blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002; ² Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, 4, Tikhoretsky Ave., Saint Petersburg, Russian Federation, 194064

ORIGINAL STUDIES

Highlights

- The list of cytokines produced by the primary human valvular, arterial, venous, and microvascular endothelial cells (ECs) is restricted to MIF, IL-6, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, MIP-3 α /CCL20, GM-CSF, G-CSF, GRO- α /CXCL1, ENA-78/CXCL5, IP-10/CXCL10, and PTX3.
- These cytokines can be classified into those with a high (MCP-1/CCL2, IL-8/CXCL8, GRO α /CXCL1, MIF, and pentraxin-3), moderate (IL-6), and low expression (GM-CSF, G-CSF, RANTES/CCL5, MIP-3 α /CCL20, ENA-78/CXCL5, and IP-10/CXCL10).
- Human internal thoracic artery endothelial cells show the highest inflammatory activity in comparison with saphenous vein endothelial cells, adipose tissue-derived microvascular endothelial cells, and aortic valve endothelial cells.

Aim To define pro-inflammatory cytokines secreted by distinct primary endothelial cells (ECs) into the cell culture medium.

Methods Primary human aortic valve endothelial cells (HAVEC) were obtained from the patients with aortic stenosis (n = 3). Primary human saphenous vein endothelial cells (HSaVEC, n = 3), internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC, n = 3), and subcutaneous adipose tissue-derived microvascular endothelial cells (HMVEC, n = 3) were isolated from the patients with coronary artery disease. Expression of *MIF*, *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL1*, *CXCL5*, *CXCL10*, *PTX3*, *SERPINE1*, *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, and *SELP* genes was performed by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction. The levels of 109 pro-inflammatory cytokines in the serum-free cell culture medium were measured by the semi-quantitative dot blot profiling with the chemiluminescent detection and densitometry. Statistical analysis was carried out using Kruskal-Wallis test with the further Dunn’s multiple comparisons test.

Results MIF, IL-6, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, GM-CSF, GRO α /CXCL1, ENA-78/CXCL5, and PTX3 were detected in the cell culture supernatant from all EC lines, whilst G-CSF, MIP-3 α /CCL20, and IP-10/CXCL10 were exclusively observed in the cell culture supernatant from HITAEC. As compared with other cell lines, HITAEC had significantly elevated expression of *CCL2*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, and *CXCL10* genes and showed a trend to the increased expression of *CXCL5* and *SERPINE1* genes. In contrast, HSaVEC and HMVEC did not demonstrate significant increase in the expression of any of the genes encoding pro-inflammatory cytokines. *CCL2*, *CXCL8*, *CXCL1*, *MIF*, *PTX3*, and *IL6* genes had higher expression in comparison to other cytokine-encoding genes regardless of the EC line.

Count of the expression ranks per each of these pro-inflammatory cytokines showed a significant relative distance between HITAEC and other EC lines.

Conclusion

We defined a list of endothelial pro-inflammatory cytokines (MIF, IL-6, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, MIP-3 α /CCL20, GM-CSF, G-CSF, GRO- α /CXCL1, ENA-78/CXCL5, IP-10/CXCL10, and PTX3) and suggested a higher pro-inflammatory status of HITAEC as compared with HAVEC, HSaVEC, and HMVEC.

Keywords

Endothelial cells • Aortic valve • Internal thoracic artery • Saphenous vein • Microvessels • Pro-inflammatory cytokines • Endothelial dysfunction

Received: 19.06.2025; received in revised form: 14.07.2025; accepted: 08.08.2025

Список сокращений

МСЭК – микрососудистые эндотелиальные клетки	ЭК-БПВ – ЭК большой подкожной вены
ЭК – эндотелиальные клетки	ЭК-ВГА – ЭК внутренней грудной артерии
ЭК-АК – ЭК аортального клапана	

Введение

Эндотелиальные клетки (ЭК) являются незаменимыми элементами системы кровообращения, обеспечивая атромбогенность сосудов, регулируя сосудистый тонус для контроля параметров артериального давления и поддерживая базальную концентрацию провоспалительных цитокинов в крови [1–4]. Последние в норме стимулируют физиологическую миграцию иммунных клеток в очаг воспаления и их паракринное взаимодействие с ЭК, в совокупности поддерживая формирование новых сосудов микроциркуляторного русла из уже имеющихся для поддержания регенерации тканей [1–4]. Воздействие пусковых факторов дисфункции эндотелия (дислипидемии, гипергликемии, азотемии, уремии, гиперфосфатемии, ишемии) стимулирует провоспалительную активацию ЭК, сопровождающуюся повышением выделения провоспалительных цитокинов в системный кровоток и индукцией патологического ангиогенеза в тканях [1–4]. Это, в свою очередь, приводит к формированию хронического стерильного системного воспаления низкой интенсивности, которое способствует прогрессированию артериальной гипертензии (за счет снижения выделения эндотелиальных вазодилататоров), нарушению паракринных взаимодействий между ЭК и гладкими миоцитами мышечной оболочки сосудов либо перицитами капилляров (что приводит к их переходу с сократительного фенотипа на синтетический и к повышению общего периферического сопротивления сосудов), дальнейшему повышению жесткости артериальной стенки (вследствие параллельного эластолиза и коллагеногенеза) и развитию феномена патологического старения (несоответствия биологического возраста хронологическому, клинически проявляющемуся синдромом старческой астении) [5, 6].

Важным аспектом физиологии ЭК является их выраженная гетерогенность, определяемая биомеханическими параметрами потока (напряжение сдвига,

выраженность циклического растяжения сосудистой стенки, систолическое и диастолическое артериальное давление), газово-электролитным составом (в частности, парциальным давлением кислорода и углекислого газа, существенно варьирующим между артериальной, венозной и капиллярной кровью), а также плотностью внеклеточного матрикса сосудов (которая существенно повышается с возрастом вследствие снижения эластичности) [7–9]. Различия биофизических и биохимических условий функционирования артериальных, венозных, микрососудистых (в особенности капиллярных) и клапанных ЭК обуславливают гетерогенность профиля экспрессируемых и выделяемых ими в системный кровоток молекул, в том числе качественного и количественного состава провоспалительных цитокинов [7–9]. Несмотря на убедительные теоретические предпосылки и транскриптомные доказательства молекулярной гетерогенности ЭК различных типов сосудов, ее физиологическая значимость и возможность применения данных фундаментальных знаний в клинической практике остаются неясными. Вместе с тем значительное количество эндотелиальных клеток (по различным оценкам, от 1 до 60 триллионов) и их непосредственный контакт с циркулирующей кровью позволяют предположить патофизиологическую и клиническую актуальность выделения ЭК провоспалительных цитокинов в системный кровоток [10, 11].

Активное изучение нормальной и патологической физиологии эндотелия подразумевает определение конкретного перечня провоспалительных цитокинов, выделяемых различными линиями ЭК. В экспериментальной практике возможно прижизненное получение ЭК аортального клапана (ЭК-АК) при его протезировании вследствие аортального стеноза, а также ЭК внутренней грудной артерии (ЭК-ВГА) и большой подкожной вены (ЭК-БПВ), активно применяемых в качестве кондуитов для коронарного шунтирования, и ЭК микрососудов подкожной жировой

ткани (МСЭК), выделяемой в процессе выполнения соответствующего хирургического доступа [12–14]. В таком экспериментальном дизайне ЭК-АК представляют собой исходно дисфункциональные ЭК (так как дисфункция эндотелия является одним из обязательных условий для развития аортального стеноза), а ЭК-БПВ, ЭК-ВГА и МСЭК – относительно интактные ЭК, полученные от пациентов с потребовавшей хирургического вмешательства ишемической болезнью сердца и сопутствующими коморбидными состояниями [12–14]. Несмотря на известные недостатки моделирования *in vitro* (невозможность одновременного сочетания характерных для состояния *in vivo* биомеханических и биохимических параметров), культивирование первичных ЭК в бессывороточной питательной среде позволяет выделить спектр провоспалительных молекул, выделяемых эндотелием в условиях депривации, соответствующей постишемическому метаболическому стрессу [12–14].

При изучении провоспалительных цитокинов *in vitro* необходимо сочетать анализ активности их выделения (при помощи измерения их концентрации методами иммуноферментного анализа, мультиплексного анализа посредством конъюгированных с антителами флуоресцентно меченных магнитных микросфер по технологии xMAP или посредством дот-блоттинга) и количественной оценки экспрессии их генов ЭК. Таким образом становится возможным параллельный анализ транскрипционной программы, а также молекулярного профиля выделяемых цитокинов. Целью данного исследования было получение первичных ЭК-АК, ЭК-БПВ, ЭК-ВГА и МСЭК, определение перечня выделяемых ими в культуральную среду эндотелиальных провоспалительных цитокинов и ранжирование экспрессии соответствующих генов.

Материалы и методы

Выделение и культивирование клеток

Первичные ЭК-АК (human aortic valve endothelial cells, HAVEC) были получены из створок АК пациентов с аортальным стенозом, госпитализированных в кардиохирургическое отделение. После извлечения створок АК с целью последующего его протезирования их немедленно переносили в клеточно-инженерную лабораторию в пробирках объемом 15 мл (601002, Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd.), заполненных средой для устойчивой пролиферации ЭК EndoBoost (EB1, AppScience Products). После доставки в лабораторию створки АК интенсивно промывали в фосфатно-солевом буфере по Дульбекко без кальция и магния (ФСБД, рН = 7.4, 1.2.4.7, Биолот) и инкубировали в течение 10 минут при 37 °С в 0.2% растворе коллагеназы IV типа (специфическая активность ≥ 160 ЕД/мг, источник – *Clostridium histolyticum*, GC305015, Wuhan Servicebio Technology Co., Ltd.). После вор-

тексирования створок АК в течение 1 минуты для открепления ЭК от базальной мембраны смыв центрифугировали при $300 \times g$ в течение 5 минут с дальнейшим высаживанием ЭК-АК в культуральные флаконы T-25 (07–9025, Biologix Plastic (Changzhou) Co., Ltd.), покрытые 0,1% желатином (1.4.6, Биолот) и заполненные средой EndoBoost. На следующий день среду EndoBoost заменяли на среду EndoBoost Plus (EB2, AppScience Products) и растили ЭК-АК до достижения конfluence.

Эндотелиальные клетки большой подкожной вены (ЭК-БПВ), внутренней грудной артерии (НТАЕС или ЭК-ВГА) и микрососудов подкожной жировой ткани (МСЭК) соответственно выделяли из сегментов БПВ (длиной ≈ 2 см) и ВГА (≈ 1 см) и фрагментов подкожной жировой ткани с окружающей стромой (общий объем ≈ 5 см³), полученных в результате коронарного шунтирования в отделении кардиохирургии № 1 клиники НИИ КПССЗ. Извлеченные биологические ткани немедленно переносили в пробирках объемом 15 мл (601002, Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd.), заполненных средой для устойчивой пролиферации ЭК EndoBoost (EB1, AppScience Products). После доставки в лабораторию ткани интенсивно промывали в ФСБД. Далее выполняли продольный разрез сегментов БПВ и ВГА и отделение фрагментов собственно подкожной жировой ткани ($\approx 1,5$ см³) от стромы (которую далее утилизировали), после чего ткани инкубировали в 0,15% растворе коллагеназы IV типа в течение 60 минут при 37 °С. После инкубации ткани аккуратно вортексировали в течение 2 минут для лучшего открепления ЭК от базальной мембраны. Ферментативную деградацию базальной мембраны останавливали добавлением 5% фетальной бычьей сыворотки (ФБС, 1.1.6.1, Биолот), предварительно растворенной в ФСБД. Сегменты БПВ и ВГА далее утилизировали, а лизат жировой ткани фильтровали через клеточные сита (диаметр пор 70 мкм, 15–1070, Biologix Plastic (Changzhou) Co., Ltd.). Суспензии ЭК-БПВ, ЭК-ВГА и МСЭК центрифугировали при $220 \times g$ в течение 5 минут при комнатной температуре и далее высаживали в культуральные флаконы T-25, покрытые фибронектином (10 мкг/мл, 1.4.11, Биолот) и заполненные средой EndoBoost. На следующий день среду EndoBoost заменяли на среду EndoBoost Plus и культивировали ЭК-БПВ, ЭК-ВГА и МСЭК до достижения конfluence.

Культуры ЭК-АК, ЭК-БПВ, ЭК-ВГА и МСЭК очищали от мезенхимальных клеток при помощи магнитной сепарации (магнит EasySep, STEMCELL Technologies) на CD31⁺ бусах (Dynabeads, 11155D, Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкцией производителя. Динамическую оценку пролиферации и морфологических характеристик культур ЭК-АК, ЭК-БПВ, ЭК-ВГА и МСЭК проводили при помощи фазово-контрастной микроско-

пии (Axio Observer.Z1, Carl Zeiss) и светлопольной микроскопии (ZOE, Bio-Rad). Чистоту ЭК-АК, ЭК-БПВ, ЭК-ВГА и МСЭК оценивали путем проточной цитометрии с использованием конъюгированных с фикоэритрин-цианином 7 моноклональных антител мыши против CD146 человека (361008, BioLegend), конъюгированных с флюоресцеинизотиоцианатом моноклональных антител мыши против CD31 человека (303104, BioLegend), конъюгированных с Alexa Fluor 700 моноклональных антител мыши против CD90 человека (328120, BioLegend) и соответствующих изотипических контролей (400126, 400108 и 400144, BioLegend). Культуры клеток с долей CD146⁺ CD90⁻ клеток $\geq 99,5\%$ относили к культурам высокой чистоты, пригодным для экспериментальной работы. Пассажи́рование (пересев) осуществляли в покрытые 0,1% желатином культуральных флаконах T-25 или T-75 (07-8075, Biologix Plastic (Changzhou) Co., Ltd.) с использованием раствора трипсина (0,25%) и этилендиаминтетрауксусной кислоты (0,53 ммоль/л) с солями Хэнкса без кальция и магния (трипсин-ЭДТА, П043п, ПанЭко) и 10% ФБС (FBS-Н1-11А, Capricorn Scientific) для ингибирования трипсина. Для адгезии ЭК к покрытию из желатина использовали культуральную среду EndoBoost, которую на следующие сутки меняли на культуральную среду EndoBoost Plus и культивировали ЭК-АК, ЭК-БПВ, ЭК-ВГА и МСЭК до достижения конfluence.

Для проведения эксперимента ЭК-АК, ЭК-БПВ, ЭК-ВГА и МСЭК ($n = 3$ донора на линию клеток, $n = 12$ доноров в совокупности) высаживали в покрытые 0,1% желатином культуральные флаконы T-25 (708003, Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd.) с использованием культуральной среды EndoBoost, которую на следующие сутки меняли на культуральную среду EndoBoost Plus и культивировали ЭК-АК, ЭК-БПВ, ЭК-ВГА и МСЭК до достижения конfluence. Непосредственно перед проведением экспериментов сывороточную среду EndoBoost заменяли на бессывороточную среду для поддержания физиологического состояния ЭК EndoLife (EL1, AppScience Products) с промежуточным двукратным промыванием ЭК ФСБД для отмывки от остаточных компонентов ФБС во избежание неспецифической кросс-реакции с бычьими антигенами при дот-блоттинге и иммуноферментном анализе. Культуры инкубировали в среде EndoLife в течение 24 часов. Исходная концентрация глюкозы в среде EndoLife составляла 5,5 ммоль/л. После этого клеточные культуры визуализировали и проводили микрофотосъемку посредством фазово-контрастной микроскопии. После забора культуральной среды клетки промывали холодным (4 °C) ФСБД и лизировали тризолом (TRIzol, 15596018, Thermo Fisher Scientific) для выделения РНК в соответствии с инструкциями производителя. Культуральную среду

центрифугировали при $220 \times g$ (5804R, Eppendorf) для осаждения клеток и при $2\,000 \times g$ (MiniSpin Plus, Eppendorf) для осаждения клеточного дебриса. Далее надосадов переносили в пробирки с предварительной гидрофобной обработкой для низкого связывания белка (Ac-ACT-017-L-B-S, Accumax Lab Devices Pvt. Ltd.) и замораживали при $-80\text{ }^\circ\text{C}$ (DW-86L486E, Qingdao Haier Biomedical Co., Ltd.) для последующего дот-блоттинга.

Анализ цитокинов методом дот-блот-профилирования

Полуколичественное измерение уровня цитокинов, выделяемых ЭК-АК, ЭК-БПВ, ЭК-ВГА и МСЭК в культуральную среду, проводили посредством дот-блоттинга. Для повышения концентрации цитокинов в культуральной среде выполняли обогащение бессывороточной среды EndoLife от каждого из 12 доноров до равных объемов (в 6 раз, с 6 мл до 1 мл) при помощи вакуумного центрифужного концентрирования (HyperVAC-LITE, Gyrozen Co. Ltd.). Далее культуральную среду от различных доноров внутри каждой из линий ЭК объединяли в один образец (пулировали) для получения усредненного результата и с целью относительной стандартизации концентрации провоспалительных молекул (для уменьшения вариабельности этого параметра вследствие различной пролиферативной активности культур ЭК в зависимости от донора). Скрининговый полуколичественный анализ содержания цитокинов, выделяемых ЭК-АК, ЭК-БПВ, ЭК-ВГА и МСЭК в культуральную среду, выполняли с использованием наборов для дот-блот профилирования Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit (ARY022B, R&D Systems) в соответствии с инструкциями производителя (1 мл обогащенной культуральной среды на образец). Хемилюминесцентную детекцию результатов дот-блоттинга проводили при помощи системы визуализации Odyssey XF (LI-COR Biosciences). Денситометрический анализ хемилюминесцентной съемки результатов дот-блоттинга выполняли в программе ImageJ (версия 1.54k, National Institutes of Health) после бинаризации изображения с использованием следующей последовательности команд: инвертирование цвета изображения (edit – invert) – выделение области фонового свечения (rectangular selection) – измерение интенсивности фонового свечения – вычитание интенсивности фонового свечения (process – math – subtract) обратное инвертирование цвета изображения до исходного (edit – invert) – собственно денситометрия областей интереса (analyze – gels – select first lane – analyze – gels – plot lanes – wand – выделение площади пика). Использование бессывороточной среды позволяло отмыть остаточные компоненты ФБС и избежать неспецифической кросс-реакции с бычьими антигенами.

Анализ генной экспрессии

Обратную транскрипцию выделенной РНК выполняли с использованием набора для синтеза кДНК М-MuLV-RH First Strand cDNA Synthesis Kit (R01-250, Евроген) и обратной транскриптазы М-MuLV-RH (R03-50, Евроген). Измерение генной экспрессии проводили при помощи количественной полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции (ОТ-кПЦР) с использованием самостоятельно разработанных праймеров (500 нмоль/л каждый, Евроген), кДНК (20 нг), мастер-микса BioMaster HS-qPCR Lo-ROX SYBR (MHR031-2040, Биолабмикс) и амплификатора ViiA 7 (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Для каждой биологической повторности ($n = 12$, по числу доноров) при измерении уровня генной экспрессии выполняли три технических повторности. Количественный анализ уровней мРНК генов интереса в лизате ЭК человека

(измерение относительных уровней транскриптов генов *MIF*, *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL1*, *CXCL5*, *CXCL10*, *PTX3*, *SERPINE1*, *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SELP*, *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, *ZEB1*, *NOS3* и *VWF*) проводили посредством пересчета их экспрессии относительно экспрессии референсного для ЭК гена (*PECAM1*) [15, 16] по методу $2^{-\Delta Ct}$. Для расчета кратности изменения экспрессии (fold change) относительно группы сравнения (инкубированные с ФСБД клетки) проводили расчет показателя $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Используемые в исследовании пары праймеров представлены в табл. 1.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software). При анализе результатов ОТ-кПЦР данные представляли в виде среднего арифметического и стандартного откло-

Таблица 1. Последовательности праймеров для количественной полимеразной цепной реакции (ОТ-кПЦР) после обратной транскрипции

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

Ген / Gene	Прямой праймер / Direct primer	Обратный праймер / Reverse primer
Провоспалительные цитокины / Pro-inflammatory cytokines		
<i>MIF</i>	5'-GGTGTCCGAGAAGTCAGGCA-3'	5'-GGGGCACGTTGGTGTTTACG-3'
<i>IL6</i>	5'-GGCACTGGCAGAAAACAACC-3'	5'-GCAAGTCTCCTCATTGAATCC-3'
<i>CXCL8</i>	5'-CAGAGACAGCAGAGCACAC-3'	5'-AGTTCCTTAGCACTCCTTGGC-3'
<i>CCL2</i>	5'-TTCTGTGCCTGCTGCTCATAG-3'	5'-AGGTGACTGGGGCATTGATTG-3'
<i>CCL5</i>	5'-AGTGGCAAGTGCTCCAACCC-3'	5'-TCAGCCGGGAGTCATACAGGA-3'
<i>CCL20</i>	5'-TGAAGGCTGTGACATCAATGCT-3'	5'-CCATCCAGAAAAGCCACAGTT-3'
<i>CSF2</i>	5'-AGCCTACCAAGCTCAAGGG-3'	5'-GGGGATGACAAGCAGAAAGTCC-3'
<i>CSF3</i>	5'-TCCAGGAGAAGCTGGTGAGTGA-3'	5'-GAGCCCCTGGTAGAGGAAAAGG-3'
<i>CXCL1</i>	5'-GCTTGCCTCAATCCTGCATCC-3'	5'-ACAATCCAGGTGGCCTCTGC-3'
<i>CXCL5</i>	5'-ATCTGCAAGTGTTCGCCATAGG-3'	5'-TCCATGCGTGCTCATTTCTCTT-3'
<i>CXCL10</i>	5'-AGGAACCTCCAGTCTCAGCAC-3'	5'-GGACAAAATTGGCTTGCAGGA-3'
<i>PTX3</i>	5'-GAACTTTCGCTCTCTCCAGCAA-3'	5'-AGAGCTTGCCCATTCGAGT-3'
<i>SERPINE1</i>	5'-CGCCGCCTCTCCACAAATC-3'	5'-AGGGCAGTTCAGGATGTCG-3'
Молекулы клеточной адгезии (рецепторы эндотелиальных клеток для лейкоцитов) / Cell adhesion molecules (endothelial cell receptors for leukocytes)		
<i>VCAM1</i>	5'-CGTCTTGGTCAGCCCTTCCT-3'	5'-ACATTCATATACTCCCGCATCCTTC-3'
<i>ICAM1</i>	5'-TTGGGCATAGAGACCCCGTT-3'	5'-GCACATTGCTCAGTTCATACACC-3'
<i>SELE</i>	5'-GCACAGCCTTGTCCAACC-3'	5'-ACCTCACAAACCCTTCG-3'
<i>SELP</i>	5'-ATGGGTGGGAACCAAAAAGG-3'	5'-GGCTGACGGACTCTTGATGTAT-3'
Транскрипционные факторы эндотелиально-мезенхимального перехода / Endothelial-to-mesenchymal transition transcription factors		
<i>SNAI1</i>	5'-CAGACCCACTCAGATGTCAAGAA-3'	5'-GGGCAGGTATGGAGAGGAAGA-3'
<i>SNAI2</i>	5'-ACTCCGAAGCCAAATGACAA-3'	5'-CTCTCTCTGTGGGTGTGTGT-3'
<i>TWIST1</i>	5'-GTCCGCAGTCTTACGAGGAG-3'	5'-GCTTGAGGGTCTGAATCTTGCT-3'
<i>ZEB1</i>	5'-GATGATGAATGCGAGTCAGATGC-3'	5'-ACAGCAGTGTCTTGTGTTGT-3'
Маркеры эндотелиального фенотипа / Endothelial phenotype markers		
<i>NOS3</i>	5'-GTGATGGCGAAGCGAGTGAAG-3'	5'-CCGAGCCCGAACACACAGAAC-3'
<i>VWF</i>	5'-CCTTGACCTCGGACCCTTATG-3'	5'-GATGCCCGTTACACCACT-3'
Гены «домашнего хозяйства» / Housekeeping genes		
<i>PECAM1</i>	5'-TGGCGCATGCCTGTAGTA-3'	5'-TCCGTTTCCTGGGTTCAA-3'

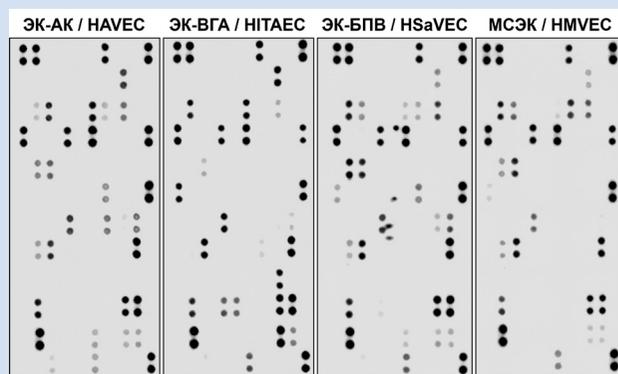
нения от среднего, а статистическую значимость различий между группами оценивали при помощи критерия Краскела-Уоллиса с поправкой на множественные сравнения по критерию Данна (статистически значимыми считали значения $p \leq 0,05$).

Результаты

Для определения перечня выделяемых ЭК провоспалительных цитокинов в первую очередь было проведено их скрининговое полуколичественное измерение методом дот-блоттинга (с использованием расширенного варианта наборов соответствующих реагентов, позволяющего детектировать 109 цитокинов человека). После шестикратного концентрирования культуральной среды, осуществляемого для повышения чувствительности анализа, в ней были детектированы фактор ингибирования миграции макрофагов (MIF), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-8 (IL-8/CXCL8), фактор привлечения моноцитов (MCP-1/CCL2), RANTES/CCL5, воспалительный белок макрофагов-3 α (MIP-3 α /CCL20), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), хемокины GRO α /CXCL1, ENA-78/CXCL5 и IP-10/CXCL10, пентраксин-3 (PTX3) и интерлейкин-17A (IL-17A, рисунок, табл. 2). При этом MIF, IL-6, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, GM-CSF, GRO α /CXCL1, ENA-78/CXCL5 и PTX3 присутствовали в культуральной среде от всех линий ЭК, а G-CSF, MIP-3 α /CCL20 и IP-10/CXCL10 – только в культуральной среде от ЭК-ВГА (рисунок, табл. 2). Это позволило предположить принципиальную схожесть спектра провоспалительных цитокинов, выделяемых всеми линиями ЭК, а также более высокую степень провоспалительной активации ЭК-ВГА в сравнении с ЭК-АК, ЭК-БПВ и МСЭК.

Помимо провоспалительных цитокинов ЭК характеризовались выделением молекул с про-ангиогенной активностью (ангиогенин, DKK-1, FGF-19, GDF-15, HGF, IGFBP2, IGFBP-3, PDGF-AA, TFF3) и анти-ангиогенной активностью (ангиопоэтин-2), а также протромботических молекул (ингибитор активатора плазминогена PAI-1, растворимая форма uPAR, тромбоспондин-1) и растворимых форм эндотелиальных рецепторов (PECAM1/CD31, ENG/CD105, VCAM1/CD106, BSG/CD147, рисунок, табл. 2). Следует отметить, что экспрессия вышеуказанных молекул варьировала между различными линиями ЭК. Ангиогенин, DKK-1, GDF-15 и ангиопоэтин-2 продуцировались всеми линиями ЭК, в то время как ЭК-АК также выделяли HGF, IGFBP-2, IGFBP-3, PDGF-AA и TFF3, ЭК-БПВ – FGF-19, HGF, IGFBP-2, PDGF-AA и TFF3, МСЭК – HGF, PDGF-AA и TFF3 (рис. 1, табл. 2). Какой-либо зависимости выделения ангиогенных молекул от линии ЭК выявлено не было (рисунок, табл. 2). Все указанные рас-

творимые формы эндотелиальных рецепторов выделялись всеми линиями ЭК, за исключением VCAM1/CD106, которые не продуцировались ЭК-АК (рис. 1, табл. 2). ЭК-ВГА выделяли большее количество VCAM1/CD106 и BSG/CD147, однако в отношении ENG/CD105 наблюдалась обратная зависимость, а содержание PECAM1/CD31 в культуральной среде от всех линий ЭК было приблизительно одинаковым (рисунок, табл. 2). Содержание PAI-1, растворимой формы uPAR и тромбоспондина-1 в культуральной среде от различных линий ЭК также существенно не различалось (рисунок, табл. 2).



	J	I	H	G	F	E	D	C	B	A
1	Ref.	PAI-1					GRO- α (CXCL1)			Ref.
2								ENA-78 (CXCL5)		
3		ST2	PDGF-AA			IL-6	HGF	ENG (CD105)		
4	CD31			MCP-1 (CCL2)		IL-8 (CXCL8)				ANG
5		TFF3	PTX3							
6	VCAM-1 (CD106)						IGFBP-2			ANGPT2
7			MIF				IGFBP-3	FGF-19	CYST C	
8		TSP-1	RANTES (CCL5)						DKK-1	
9								G-CSF		
10		uPAR	MIP-3 α (CCL20)	IP-10 (CXCL10)				GDF-15	EGF	
11		VEGF				IL-17A		GM-CSF	BSG (CD147)	
12	Neg.					IL-18 Bpa				Ref.

Анализ содержания провоспалительных цитокинов в предварительно центрифугированной (2 000 \times g) обогащенной (в 6 раз) бессывороточной культуральной среде от первичных эндотелиальных клеток аортального клапана (ЭК-АК), большой подкожной вены (ЭК-БПВ), внутренней грудной артерии (ЭК-ВГА) и микрососудов подкожной жировой ткани (МСЭК) человека, инкубированных в течение 24 часов после достижения конfluence. Дот-блоттинг. Сверху: результаты хемилуминесцентной детекции цитокинов на мембранах. Снизу: расположение провоспалительных цитокинов на мембранах. Провоспалительные цитокины выделены розовым цветом, ангиогенные молекулы – красным цветом, протромботические молекулы – зеленым цветом, растворимые формы эндотелиальных рецепторов – желтым цветом, прочие молекулы – голубым цветом

Measurement of pro-inflammatory cytokines in the pre-centrifuged (2 000 \times g) and enriched (6-fold) serum-free cell culture supernatant from primary human aortic valve endothelial cells (HAVEC), human saphenous vein endothelial cells (HSAVEC), human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC), and adipose tissue-derived microvascular endothelial cells (HMVEC) incubated for 24 hours. Top: chemiluminescent detection of cytokines on the dot blot membranes. Bottom: distribution of pro-inflammatory cytokines on the dot blot membranes. Pro-inflammatory cytokines are marked pink, angiogenic molecules are marked red, pro-thrombotic molecules are marked green, soluble endothelial receptors are marked yellow, other molecules are marked blue

Анализ экспрессии генов провоспалительных цитокинов (*MIF, IL6, CXCL8, CCL2, CCL5, CCL20, CSF2, CSF3, CXCL1, CXCL5, CXCL10, PTX3, SERPINE1*) в ЭК-АК от пациентов с аортальным стенозом и в ЭК-ВГА, ЭК-БПВ и МСЭК от пациентов с ишемической болезнью сердца подтвердил наиболее высокий уровень провоспалительной активации в ЭК-ВГА (табл. 3). В качестве линии сравнения были выбраны ЭК-АК,

представлявшие собой клапанные, а не сосудистые ЭК. В сравнении с остальными изученными линиями ЭК-ВГА характеризовались статистически значимо ($p \leq 0,05$), повышенной экспрессией генов *CCL2, CCL20, CSF2, CSF3* и *CXCL10*, а также тенденцией ($p \leq 0,10$) к значимому повышению экспрессии генов *CXCL5* и *SERPINE1* (табл. 3). В то же время в ЭК-БПВ и МСЭК не было выявлено даже тенденции ($p \leq 0,10$)

Таблица 2. Денситометрический полуколичественный анализ результатов измерения уровня цитокинов (метод дот-блот-профилирования, хемиллюминесцентная съемка) в предварительно центрифугированной (2 000 × g) обогащенной (в 6 раз) бессывороточной культуральной среде от первичных эндотелиальных клеток аортального клапана (ЭК-АК), большой подкожной вены (ЭК-БПВ), внутренней грудной артерии (ЭК-ВГА) и микрососудов подкожной жировой ткани (МСЭК) человека, инкубированных в бессывороточной культуральной среде в течение 24 часов после достижения конfluenceности
Table 2. Semi-quantitative analysis of cytokine levels (dot blot profiling, chemiluminescent imaging, densitometry analysis) in the pre-centrifuged (2 000 × g) and enriched (6-fold) serum-free cell culture supernatant from primary human aortic valve endothelial cells (HAVEC), human saphenous vein endothelial cells (HSaVEC), human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC), and adipose tissue-derived microvascular endothelial cells (HMVEC) incubated for 24 hours

Место на мембране / Position on the membrane	Анализируемая молекула / Analyte	Номер гена / Gene number	ЭК-АК / HAVEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-БПВ / HSaVEC	МСЭК / HMVEC
A7, 8	Angiogenin	283	39 831	20 639	32 409	27 693
A11, 12	Angiopoietin-2/ANGPT2	285	47 222	33 999	41 827	47 330
B13, 14	Cystatin C	1 471	14 416	1 727	17 403	
B15, 16	Dkk-1	22 943	36 923	32 395	22 799	31 881
B19, 20	EGF	1 950	39 011	37 493	39 394	29 569
B21, 22	CD147/Basigin/EMMPRIN	682	5 122	8 072	4 284	2 068
C3, 4	ENA-78/CXCL5	6 374	23 487	32 152	9 119	10 740
C5, 6	Endoglin/ENG/CD105	2 022	29 041	4 387	18 855	18 064
C13, 14	FGF-19	9 965			4 774	
C17, 18	G-CSF	1 440		24 526		
C19, 20	GDF-15	9 518	27 119	30 601	34 869	28 893
C21, 22	GM-CSF	1 437	3 898	37 816	4 667	2 103
D1, 2	Groα/CXCL1	2 919	30 271	27 788	28 153	25 025
D5, 6	HGF	3 082	3 987		5 604	28 595
D11, 12	IGFBP-2	3 485	8 413		10 143	
D13, 14	IGFBP-3	3 486	14 333			
D15, 16	IL-1α	3 552		648		
E5, 6	IL-6	3 569	30 392	72 821	3 338	1 260
E7, 8	IL-8/CXCL8	3 576	41 429	34 169	38 529	42 017
E21, 22	IL-17A	3 605	4 691		2 193	
E23, 24	IL-18 Bpa	10 068	6 839	18 780	29 799	30 204
F19, 20	IP-10/CXCL10	3 627		11 136		
G7, 8	MCP-1/CCL2	6 347	27 491	22 283	24 270	28 436
G13, 14	MIF	4 282	23 859	28 336	27 988	15 292
G19, 20	MIP-3α/CCL20	6 364		14 462		
H5, 6	PDGF-AA	5 154	26 539		9 824	15 233
H9, 10	Pentraxin-3	5 806	25 098	4 443	22 542	29 601
H15, 16	RANTES/CCL5	6 352	17 525	25 202	14 429	29 696
I1, 2	PAI-1/serpin E1	5 054	37 450	37 419	41 212	40 348
I5, 6	ST2	9 173	3 174	22 446	28 198	28 710
I9, 10	TFF3	7 033	18 470		31 710	9 818
I15, 16	Thrombospondin-1/TSP-1	7 057	5 664		3 231	5 627
I19, 20	uPAR	5 329	22 816	17 391	22 201	18 743
I21, 22	VEGF	7 422	44 814	45 420	44 892	46 175
J7, 8	PECAM-1/CD31	5 175	30 513	36 971	36 685	35 429
J11, 12	VCAM-1/CD106	7 412		21 757	4 915	1 213

Таблица 3. Результаты эксперимента по анализу генной экспрессии первичных эндотелиальных клеток аортального клапана (ЭК-АК), большой подкожной вены (ЭК-БПВ), внутренней грудной артерии (ЭК-ВГА) и микрососудов подкожной жировой ткани (МСЭК) человека, инкубированных в бессывороточной культуральной среде в течение 24 часов после достижения конfluence. Количественная полимеразная цепная реакция после обратной транскрипции, нормализация на референсный ген (*PECAMI*). Относительный уровень экспрессии (ΔCt , среднее арифметическое и стандартное отклонение), ранг (ранжирование линий эндотелиальных клеток по относительному уровню экспрессии друг относительно друга), кратность изменения экспрессии и статистическая значимость различий (значение вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу P) генов, кодирующих провоспалительные цитокины (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL5*, *CXCL10*, *PTX3*, *SERPINE1*), провоспалительные молекулы клеточной адгезии (рецепторы эндотелиальных клеток для лейкоцитов *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SELP*), транскрипционные факторы эндотелиально-мезенхимального перехода (*SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, *ZEB1*) и маркеры эндотелиального фенотипа (*NOS3*, *VWF*). Критерий Краскела-Уоллиса с последующей поправкой на множественные сравнения по критерию Данна. Статистически значимые различия (кратности изменения и соответствующие им значения P) помечены пурпурно-розовым цветом (в случае кратности измерения $\geq 2,00$ и $p < 0,05$), бледно-розовым цветом (в случае кратности измерения $\geq 2,00$ и $0,10 \leq P \leq 0,05$), темно-зеленым цветом (в случае кратности измерения $\leq 0,50$ и $P < 0,05$) и светло-зеленым цветом (в случае кратности измерения $\leq 0,50$ и $0,10 \leq P \leq 0,05$) и выделены жирным шрифтом

Table 3. Analysis of the gene expression in the primary human aortic valve endothelial cells (HAVEC), human saphenous vein endothelial cells (HSaVEC), human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC), and adipose tissue-derived microvascular endothelial cells (HMVEC) incubated in the serum-free cell culture medium for 24 hours after reaching the confluence. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction, normalisation by the reference gene (*PECAMI*). Relative expression level (ΔCt , arithmetic mean and the standard deviation), rank (ranking of the EC lines by the relative expression level), fold change, and statistical significance (P value) of the genes encoding pro-inflammatory cytokines (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL5*, *CXCL10*, *PTX3*, and *SERPINE1*), pro-inflammatory cell adhesion molecules (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, and *SELP*), endothelial-to-mesenchymal transition transcription factors (*SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, and *ZEB1*), and endothelial phenotype markers (*NOS3*, *VWF*). Kruskal-Wallis test with the further Dunn's multiple comparisons test. Statistically significant differences (fold change and the corresponding P values) are marked bright pink (fold change $\geq 2,00$ and P value $< 0,05$), pale pink (fold change $\geq 2,00$ and p value $0,10 \leq P \leq 0,05$), dark green (fold change $\leq 0,50$ and P value $< 0,05$) and light green (fold change $\leq 0,50$ and P value $0,10 \leq P \leq 0,05$) and marked bold

Ген / Gene	ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean	ЭК-АК / HAVEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-БПВ / HSaVEC	МСЭК / HMVEC
	ΔCt , стандартное отклонение / ΔCt , standard deviation				
	Ранг / Rank				
	Кратность изменения экспрессии / Fold change				
	Значение P / P value				
Провоспалительные цитокины / Pro-inflammatory cytokines					
<i>MIF</i>	ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean	0,59680	0,53720	0,20930	0,64100
	ΔCt , стандартное отклонение / ΔCt , standard deviation	0,44420	0,18850	0,08729	0,63780
	Ранг / Rank	2	3	4	1
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	0,90	0,35	1,07
	Значение P / P value	1,000	> 0,9999	0,0539	> 0,9999
<i>IL6</i>	ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean	0,03236	0,21760	0,00424	0,02782
	ΔCt , стандартное отклонение / ΔCt , standard deviation	0,03090	0,23440	0,00453	0,03572
	Ранг / Rank	2	1	4	3
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	6,72	0,13	0,86
	Значение P / P value	1,000	0,9183	0,2474	> 0,9999
<i>CXCL8</i>	ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean	0,29310	2,80000	0,14200	0,19040
	ΔCt , стандартное отклонение / ΔCt , standard deviation	0,11700	2,16500	0,09453	0,22350
	Ранг / Rank	2	1	4	3
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	9,55	0,48	0,65
	Значение P / P value	1,000	0,2026	> 0,9999	> 0,9999
<i>CCL2</i>	ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean	0,63580	2,18400	0,64810	1,08500
	ΔCt , стандартное отклонение / ΔCt , standard deviation	0,33350	1,16500	0,38540	0,57370
	Ранг / Rank	4	1	3	2
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	3,44	1,02	1,71
	Значение P / P value	1,000	0,0173	> 0,9999	> 0,9999
<i>CCL5</i>	ΔCt , среднее арифметическое / ΔCt , arithmetic mean	0,00059	0,00055	0,00012	0,00016
	ΔCt , стандартное отклонение / ΔCt , standard deviation	0,00079	0,00043	0,00009	0,00011
	Ранг / Rank	1	2	4	3
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	0,93	0,21	0,28
	Значение P / P value	1,000	> 0,9999	0,1335	0,4751

<i>CCL20</i>	Δ Ct, среднее арифметическое / Δ Ct, arithmetic mean	0,00053	0,04921	0,00152	0,00130
	Δ Ct, стандартное отклонение / Δ Ct, standard deviation	0,00042	0,04320	0,00159	0,00108
	Ранг / Rank	4	1	2	3
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	92,22	2,85	2,43
	Значение P / P value	1,000	0,0012	> 0,9999	> 0,9999
<i>CSF2</i>	Δ Ct, среднее арифметическое / Δ Ct, arithmetic mean	0,00055	0,04623	0,00103	0,00194
	Δ Ct, стандартное отклонение / Δ Ct, standard deviation	0,00016	0,04887	0,00123	0,00158
	Ранг / Rank	4	1	3	2
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	83,73	1,87	3,51
	Значение P / P value	1,000	0,0057	> 0,9999	0,9907
<i>CSF3</i>	Δ Ct, среднее арифметическое / Δ Ct, arithmetic mean	0,00006	0,07912	0,00009	0,00037
	Δ Ct, стандартное отклонение / Δ Ct, standard deviation	0,00005	0,17730	0,00015	0,00034
	Ранг / Rank	4	1	3	2
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	1 314,29	1,54	6,15
	Значение P / P value	1,000	0,0076	> 0,9999	0,4751
<i>CXCL1</i>	Δ Ct, среднее арифметическое / Δ Ct, arithmetic mean	0,17480	2,72900	0,13770	0,09486
	Δ Ct, стандартное отклонение / Δ Ct, standard deviation	0,05190	2,09100	0,11040	0,06156
	Ранг / Rank	2	1	3	4
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	15,61	0,79	0,54
	Значение P / P value	1,000	0,1198	> 0,9999	> 0,9999
<i>CXCL5</i>	Δ Ct, среднее арифметическое / Δ Ct, arithmetic mean	0,00151	0,04374	0,00089	0,00559
	Δ Ct, стандартное отклонение / Δ Ct, standard deviation	0,00060	0,03501	0,00058	0,00880
	Ранг / Rank	3	1	4	2
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	29,01	0,59	3,71
	Значение P / P value	1,000	0,1074	> 0,9999	> 0,9999
<i>CXCL10</i>	Δ Ct, среднее арифметическое / Δ Ct, arithmetic mean	0,00005	0,00390	0,00007	0,00013
	Δ Ct, стандартное отклонение / Δ Ct, standard deviation	0,00005	0,00268	0,00003	0,00023
	Ранг / Rank	4	1	3	2
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	79,45	1,45	2,70
	Значение P / P value	1,000	0,0065	> 0,9999	> 0,9999
<i>PTX3</i>	Δ Ct, среднее арифметическое / Δ Ct, arithmetic mean	0,36190	0,45860	0,05035	0,02680
	Δ Ct, стандартное отклонение / Δ Ct, standard deviation	0,14830	0,43240	0,02506	0,03960
	Ранг / Rank	2	1	3	4
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	1,27	0,14	0,07
	Значение P / P value	1,000	> 0,9999	0,0682	0,0049
<i>SERPINE1</i>	Δ Ct, среднее арифметическое / Δ Ct, arithmetic mean	5,66500	19,42000	4,35000	7,17800
	Δ Ct, стандартное отклонение / Δ Ct, standard deviation	2,18100	9,69000	3,95700	4,63300
	Ранг / Rank	3	1	4	2
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	3,43	0,77	1,27
	Значение P / P value	1,000	0,0766	> 0,9999	> 0,9999
Молекулы клеточной адгезии (рецепторы эндотелиальных клеток для лейкоцитов) / Cell adhesion molecules (endothelial cell receptors for leukocytes)					
<i>VCAM1</i>	Δ Ct, среднее арифметическое / Δ Ct, arithmetic mean	0,00002	0,00159	0,00030	0,00014
	Δ Ct, стандартное отклонение / Δ Ct, standard deviation	0,00001	0,00074	0,00020	0,00005
	Ранг / Rank	4	1	2	3
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	84,26	16,21	7,51
	Значение P / P value	1,000	< 0,0001	0,0423	0,5185

<i>ICAM1</i>	Δ Ct, среднее арифметическое / Δ Ct, arithmetic mean	0,04389	0,29760	0,05379	0,06221
	Δ Ct, стандартное отклонение / Δ Ct, standard deviation	0,05141	0,26780	0,03466	0,08479
	Ранг / Rank	4	1	3	2
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	6,78	1,23	1,42
	Значение <i>P</i> / <i>P</i> value	1,000	0,0291	> 0,9999	> 0,9999
<i>SELE</i>	Δ Ct, среднее арифметическое / Δ Ct, arithmetic mean	0,00040	0,01276	0,01112	0,00360
	Δ Ct, стандартное отклонение / Δ Ct, standard deviation	0,00043	0,00727	0,01292	0,00193
	Ранг / Rank	4	1	2	3
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	31,73	27,65	8,96
	Значение <i>P</i> / <i>P</i> value	1,000	0,0014	0,0291	0,1829
<i>SELP</i>	Δ Ct, среднее арифметическое / Δ Ct, arithmetic mean	0,00076	0,00061	0,00117	0,00020
	Δ Ct, стандартное отклонение / Δ Ct, standard deviation	0,00060	0,00038	0,00081	0,00011
	Ранг / Rank	2	3	1	4
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	0,80	1,53	0,27
	Значение <i>P</i> / <i>P</i> value	1,000	> 0,9999	> 0,9999	0,3623
Сумма рангов / Total rank sum		51	22	52	45
Транскрипционные факторы эндотелиально-мезенхимального перехода / Endothelial-to-mesenchymal transition transcription factors					
<i>SNAI1</i>	Δ Ct, среднее арифметическое / Δ Ct, arithmetic mean	0,01142	0,01188	0,00328	0,01473
	Δ Ct, стандартное отклонение / Δ Ct, standard deviation	0,00613	0,00698	0,00270	0,01221
	Ранг / Rank	3	2	4	1
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	1,04	0,29	1,29
	Значение <i>P</i> / <i>P</i> value	1,000	> 0,9999	0,0607	> 0,9999
<i>SNAI2</i>	Δ Ct, среднее арифметическое / Δ Ct, arithmetic mean	0,01640	0,00141	0,00556	0,03949
	Δ Ct, стандартное отклонение / Δ Ct, standard deviation	0,01212	0,00012	0,01045	0,05015
	Ранг / Rank	2	4	3	1
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	0,09	0,34	2,41
	Значение <i>P</i> / <i>P</i> value	1,000	0,3972	0,2474	> 0,9999
<i>TWIST1</i>	Δ Ct, среднее арифметическое / Δ Ct, arithmetic mean	0,00373	0,00018	0,00017	0,00312
	Δ Ct, стандартное отклонение / Δ Ct, standard deviation	0,00229	0,00014	0,00028	0,00449
	Ранг / Rank	1	3	4	2
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	0,05	0,05	0,84
	Значение <i>P</i> / <i>P</i> value	1,000	0,0256	0,0042	> 0,9999
<i>ZEB1</i>	Δ Ct, среднее арифметическое / Δ Ct, arithmetic mean	0,05800	0,04837	0,00839	0,06630
	Δ Ct, стандартное отклонение / Δ Ct, standard deviation	0,01883	0,01816	0,00606	0,03630
	Ранг / Rank	2	3	4	1
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	0,83	0,14	1,14
	Значение <i>P</i> / <i>P</i> value	1,000	> 0,9999	0,0100	> 0,9999
Маркеры эндотелиального фенотипа / Endothelial phenotype markers					
<i>NOS3</i>	Δ Ct, среднее арифметическое / Δ Ct, arithmetic mean	0,01889	0,00628	0,00694	0,00387
	Δ Ct, стандартное отклонение / Δ Ct, standard deviation	0,01114	0,00178	0,00310	0,00326
	Ранг / Rank	1	3	2	4
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	0,33	0,37	0,20
	Значение <i>P</i> / <i>P</i> value	1,000	0,0330	0,0961	0,0017
<i>VWF</i>	Δ Ct, среднее арифметическое / Δ Ct, arithmetic mean	0,16270	1,28600	0,49190	0,74260
	Δ Ct, стандартное отклонение / Δ Ct, standard deviation	0,14010	0,38880	0,27330	0,26300
	Ранг / Rank	4	1	3	2
	Кратность изменения экспрессии / Fold change	1,00	7,90	3,02	4,56
	Значение <i>P</i> / <i>P</i> value	1,000	0,0003	0,5185	0,0682
Сумма рангов / Total rank sum		13	16	20	11

к значимому повышению хотя бы одного из генов провоспалительных цитокинов (табл. 3). Анализ генов провоспалительных молекул клеточной адгезии (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SELP*) также выявил статистически значимое повышение экспрессии трех из четырех данных генов (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*) в ЭК-ВГА и отсутствие такового у МСЭК, однако ЭК-БПВ также продемонстрировали статистически значимое повышение экспрессии генов *VCAM1* и *SELE* (табл. 3). Подсчет суммы рангов абсолютной экспрессии по каждому из 13 исследованных провоспалительных цитокинов и 4 молекул клеточной адгезии (где ранг 1 соответствовал наиболее высокому, а ранг 4 – наиболее низкому уровню экспрессии в каждой из четырех линий ЭК) показал существенное относительное расстояние между ЭК-ВГА (с суммой рангов 22) и остальными линиями ЭК (сумма рангов для ЭК-АК – 51, для ЭК-БПВ – 52, для МСЭК – 45, табл. 3). Подобный метод анализа результатов дот-блоттинга является непосредственным аналогом критериев непараметрической статистики и использует ранги вместо абсолютных денситометрических значений вследствие нелинейности свечения при хемилюминесцентной схеме детекции [15, 17].

С целью технической валидации проведенного анализа генной экспрессии был также проведен анализ генов основных транскрипционных факторов эндотелиально-мезенхимального перехода (*SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, *ZEB1*) и маркеров эндотелиального фенотипа (*NOS3*, *VWF*). В отличие от провоспалительных цитокинов и молекул клеточной адгезии, ЭК-ВГА имели статистически значимо сниженную экспрессию генов *TWIST1* и *NOS3*, хотя также отличались статистически значимо повышенной экспрессией гена, кодирующего фактор фон Виллебранда (*VWF*, табл. 3). ЭК-БПВ характеризовались статистически значимым снижением экспрессии генов *SNAI1* и *TWIST1* и тенденцией к снижению экспрессии гена *NOS3*, а МСЭК – статистически значимым снижением экспрессии гена *NOS3* (табл. 3). Устойчивой картины относительного повышения экспрессии генов эндотелиально-мезенхимального перехода, отмечающейся при индуцированной провоспалительной активации ЭК, не наблюдалось ни в одной из изученных линий ЭК (табл. 3). Наиболее высокая экспрессия генов транскрипционного факторов эндотелиально-мезенхимального перехода наблюдалась в МСЭК, однако различия между МСЭК и ЭК-АК не достигали статистической значимости (табл. 3). Относительная экспрессия маркеров эндотелиального фенотипа также варьировала между различными линиями ЭК (к примеру, ЭК-АК имели повышенную экспрессию гена *NOS3*, но сниженную экспрессию гена *VWF*), что подтверждало техническую валидность анализа (табл. 3).

Далее было выполнено сравнение рангов экс-

прессии генов провоспалительных цитокинов (без учета молекул клеточной адгезии) друг относительно друга в мРНК от ЭК-АК, ЭК-БПВ, ЭК-ВГА и МСЭК при ОТ-кПЦР и рангов уровня кодируемых ими белков. В то время как на уровне транскрипции ЭК-ВГА демонстрировали наиболее высокий уровень провоспалительной активации (с суммой рангов 16) в сравнении с остальными линиями ЭК (сумма рангов для ЭК-АК – 37, для ЭК-БПВ – 44, для МСЭК – 33), при измерении уровня непосредственно выделяемых в культуральную среду цитокинов подобной зависимости не наблюдалось (сумма рангов для ЭК-АК – 29, для ЭК-ВГА – 28, для ЭК-БПВ – 33, для МСЭК – 31), однако при этом три цитокина (*G-CSF*, *MIP-3α/CCL20* и *IP-10/CXCL10*) определялись исключительно в культуральной среде от ЭК-ВГА (табл. 4). Таким образом, суммарно результаты ОТ-кПЦР и дот-блоттинга свидетельствовали о более выраженной провоспалительной активации ЭК-ВГА в сравнении с ЭК-АК, ЭК-БПВ и МСЭК.

Ранжирование генов провоспалительных цитокинов по их относительному уровню экспрессии показало, что шесть из них (*CCL2*, *CXCL8*, *CXCL1*, *MIF*, *PTX3*, *IL6*) стабильно обладали более высокой экспрессией в сравнении с остальными независимо от клеточной линии (табл. 5, табл. 6). Исключение ЭК-ВГА из анализа также не изменило общей картины ранжирования относительного уровня экспрессии провоспалительных цитокинов в ЭК, при этом экспрессия гена *CCL2* стабильно опережала экспрессию остальных генов эндотелиальных провоспалительных цитокинов, а ген *IL6* служил неким условным рубежом, разделяющим цитокины с относительно высокой и относительно низкой экспрессией (табл. 5, табл. 6). Из всех исследованных генов цитокинов наиболее низкая экспрессия отмечалась в генах *CCL5* и *CXCL10*, которые стабильно занимали два из трех последних рангов (табл. 5, табл. 6).

Таким образом, в сочетании с результатами дот-блоттинга проведенный анализ генной экспрессии позволил предположить, что исходно наиболее выраженная провоспалительная активация наблюдается в ЭК-ВГА, в то время как экспрессия генов провоспалительных цитокинов и молекул клеточной адгезии в ЭК-АК, ЭК-БПВ и МСЭК существенно ниже. Всего первичные ЭК экспрессировали и выделяли в культуральную среду 12 провоспалительных цитокинов (*MCP-1/CCL2*, кодируемый геном *CCL2*; *IL-8/CXCL8*, кодируемый геном *CXCL8*; *GROα/CXCL1*, кодируемый геном *CXCL1*; *MIF*, кодируемый геном *MIF*; пентраксин-3, кодируемый геном *PTX3*; *IL-6*, кодируемый геном *IL6*; *G-CSF*, кодируемый геном *CSF3*; *MIP-3α/CCL20*, кодируемый геном *CCL20*; *ENA-78/CXCL5*, кодируемый геном *CXCL5*; *GM-CSF*, кодируемый геном *CSF2*; *IP-10/CXCL10*, кодируемый геном *CXCL10*; *RANTES/CCL5*, кодируемый геном *CCL5*).

Обсуждение

Выделяемые ЭК провоспалительные цитокины являются одними из основных молекулярных медиаторов, регулирующих патологический ответ эндотелия на воздействие различных факторов риска, в том числе обуславливающих развитие коморбидных состояний [1–4]. Как правило, пациенты с аортальным стенозом или ишемической болезнью сердца характеризуются мультиморбидностью, ко-

торая в сочетании с возможностью прижизненно-го выделения ЭК при протезировании АК или при коронарном шунтировании делает клинически актуальным получение ЭК-АК, ЭК-ВГА, ЭК-БПВ и МСЭК с целью последующей экспериментальной работы [18, 19]. Несомненным преимуществом такого сценария является возможность выделения ЭК-ВГА, ЭК-БПВ и МСЭК от одного и того же пациента, что позволяет исключить межиндиви-

Таблица 4. Сравнение рангов (по относительно уровню экспрессии друг относительно друга) экспрессии (ΔCt , среднее арифметическое, нормализация на референсный ген *PECAM1*) генов провоспалительных цитокинов (*MIF*, *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL1*, *CXCL5*, *CXCL10*, *PTX3*, *SERPINE1*) при количественной полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции (ОТ-кПЦР) и уровня кодируемых ими белков (*MIF*, *IL-6*, *IL-8/CXCL8*, *MCP-1/CCL2*, *RANTES/CCL5*, *MIP-3 α /CCL20*, *GM-CSF*, *G-CSF*, *GRO α /CXCL1*, *ENA-78/CXCL5*, *IP-10/CXCL10*, *PTX3*, *PAI-1*) в культуральной среде при дот-блоттинге. В качестве материала использовались мРНК и культуральная среда от первичных эндотелиальных клеток аортального клапана (ЭК-АК), внутренней грудной артерии (ЭК-ВГА), большой подкожной вены (ЭК-БПВ) и микрососудов подкожной жировой ткани (МСЭК) человека, инкубированных в бессывороточной культуральной среде в течение 24 часов после достижения конfluence

Table 4. Comparison of the gene expression ranks (calculated by the relative expression levels, ΔCt , arithmetic mean, normalisation by the reference gene (*PECAM1*) of pro-inflammatory cytokines (*MIF*, *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL1*, *CXCL5*, *CXCL10*, *PTX3*, *SERPINE1*) at reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction and protein expression ranks (*MIF*, *IL-6*, *IL-8/CXCL8*, *MCP-1/CCL2*, *RANTES/CCL5*, *MIP-3 α /CCL20*, *GM-CSF*, *G-CSF*, *GRO α /CXCL1*, *ENA-78/CXCL5*, *IP-10/CXCL10*, *PTX3*, *PAI-1*) in the cell culture medium at dot blotting. mRNA and cell culture medium from HAVEC, HITAEC, HSAVEC, and HMVEC incubated in the serum-free cell culture medium for 24 hours after reaching the confluence

Ген / Gene	Ранг при ОТ-кПЦР / RT-qPCR rank	ЭК-АК / HAVEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-БПВ / HSAVEC	МСЭК / HMVEC
	Ранг при дот-блоте / Dot blot rank				
<i>MIF</i>	Ранг при ОТ-кПЦР / RT-qPCR rank	2	3	4	1
	Ранг при дот-блоте / Dot blot rank	3	1	2	4
<i>IL6</i>	Ранг при ОТ-кПЦР / RT-qPCR rank	2	1	4	3
	Ранг при дот-блоте / Dot blot rank	2	1	3	4
<i>CXCL8</i>	Ранг при ОТ-кПЦР / RT-qPCR rank	2	1	4	3
	Ранг при дот-блоте / Dot blot rank	2	4	3	1
<i>CCL2</i>	Ранг при ОТ-кПЦР / RT-qPCR rank	4	1	3	2
	Ранг при дот-блоте / Dot blot rank	2	4	3	1
<i>CCL5</i>	Ранг при ОТ-кПЦР / RT-qPCR rank	1	2	4	3
	Ранг при дот-блоте / Dot blot rank	3	2	4	1
<i>CCL20</i>	Ранг при ОТ-кПЦР / RT-qPCR rank	4	1	2	3
	Ранг при дот-блоте / Dot blot rank	2	1	2	2
<i>CSF2</i>	Ранг при ОТ-кПЦР / RT-qPCR rank	4	1	3	2
	Ранг при дот-блоте / Dot blot rank	3	1	2	4
<i>CSF3</i>	Ранг при ОТ-кПЦР / RT-qPCR rank	4	1	3	2
	Ранг при дот-блоте / Dot blot rank	2	1	2	2
<i>CXCL1</i>	Ранг при ОТ-кПЦР / RT-qPCR rank	2	1	3	4
	Ранг при дот-блоте / Dot blot rank	1	3	2	4
<i>CXCL5</i>	Ранг при ОТ-кПЦР / RT-qPCR rank	3	1	4	2
	Ранг при дот-блоте / Dot blot rank	2	1	4	3
<i>CXCL10</i>	Ранг при ОТ-кПЦР / RT-qPCR rank	4	1	3	2
	Ранг при дот-блоте / Dot blot rank	2	1	2	2
<i>PTX3</i>	Ранг при ОТ-кПЦР / RT-qPCR rank	2	1	3	4
	Ранг при дот-блоте / Dot blot rank	2	4	3	1
<i>SERPINE1</i>	Ранг при ОТ-кПЦР / RT-qPCR rank	3	1	4	2
	Ранг при дот-блоте / Dot blot rank	3	4	1	2
Сумма рангов при ОТ-кПЦР / Total rank sum, RT-qPCR		37	16	44	33
Сумма рангов при дот-блоте / Total rank sum, dot blot		29	28	33	31

дуальную вариабельность при анализе геной экспрессии, хотя успешность одновременного выделения всех указанных линий в значительной степени зависит от объема предоставляемого материала, а также от используемой культуральной среды. С учетом патофизиологической релевантности выделения всех указанных клеточных линий в данной работе был выполнен анализ содержания провоспалительных цитокинов в культуральной среде при помощи расширенного набора для их определения методом дот-блоттинга, а также оценка экспрессии соответствующих генов методом ОТ-кПЦР.

Традиционно в культуре ЭК анализируют экспрессию MCP-1/CCL2, IL-8/CXCL8 и IL-6, которые являются чувствительными и специфичными марке-

рами для принципиального определения дисфункции эндотелия *in vitro* [12, 13, 20], однако не предоставляют полной картины о провоспалительной активации эндотелия. Напротив, даже в профильной литературе распространено заблуждение о том, что ЭК продуцируют десятки цитокинов, в частности, фактор некроза опухоли-альфа (TNF- α) и интерлейкин-1 β (IL-1 β); это не вполне соответствует экспериментальным наблюдениям и затрудняет оценку объективного вклада дисфункции эндотелия в развитие системного воспалительного ответа [5, 6]. Возможным выходом из ситуации является проведение анализа секрета (совокупности выделяемых ЭК в микроокружение молекул) посредством масс-спектрометрического анализа, однако содержание выделяемых ЭК цитокинов отно-

Таблица 5. Ранжирование генов провоспалительных цитокинов (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL5*, *CXCL10*, *PTX3*) по уровню экспрессии в первичных эндотелиальных клетках аортального клапана (ЭК-АК), большой подкожной вены (ЭК-БПВ), внутренней грудной артерии (ЭК-ВГА) и микрососудов подкожной жировой ткани (МСЭК) человека, инкубированных в бессывороточной культуральной среде в течение 24 часов после достижения конfluence. Количественная полимеразная цепная реакция после обратной транскрипции. Относительный уровень экспрессии (Δ Сt, среднее арифметическое, нормализация на референсный ген *PECAMI*) и ранг (ранжирование генов по относительному уровню экспрессии друг относительно друга)

Table 5. Ranking of genes encoding pro-inflammatory cytokines (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL5*, *CXCL10*, and *PTX3*) by expression level in primary human aortic valve endothelial cells (HAVEC), human saphenous vein endothelial cells (HSaVEC), human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC), and adipose tissue-derived microvascular endothelial cells (HMVEC) incubated in the serum-free cell culture medium for 24 hours after reaching the confluence. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction, relative expression level (Δ Сt, arithmetic mean, normalisation by the reference gene *PECAMI*) and rank (ranking of the genes by the relative expression level)

Ген / Gene	Δ Сt, среднее арифметическое / Δ Сt, arithmetic mean	ЭК-АК / HAVEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-БПВ / HSaVEC	МСЭК / HMVEC	Среднее / Average
	Ранг / Rank					
<i>CCL2</i>	Δ Сt, среднее арифметическое / Δ Сt, arithmetic mean	0,63580	2,18400	0,64810	1,08500	1,13825
	Ранг / Rank	1	3	1	1	1
<i>CXCL8</i>	Δ Сt, среднее арифметическое / Δ Сt, arithmetic mean	0,29310	2,80000	0,14200	0,19040	0,85648
	Ранг / Rank	4	1	3	3	2
<i>CXCL1</i>	Δ Сt, среднее арифметическое / Δ Сt, arithmetic mean	0,17480	2,72900	0,13770	0,09486	0,78415
	Ранг / Rank	5	2	4	4	3
<i>MIF</i>	Δ Сt, среднее арифметическое / Δ Сt, arithmetic mean	0,59680	0,53720	0,20930	0,64100	0,49607
	Ранг / Rank	2	4	2	2	4
<i>PTX3</i>	Δ Сt, среднее арифметическое / Δ Сt, arithmetic mean	0,36190	0,45860	0,05035	0,02680	0,22441
	Ранг / Rank	3	5	5	6	5
<i>IL6</i>	Δ Сt, среднее арифметическое / Δ Сt, arithmetic mean	0,03236	0,21760	0,00424	0,02782	0,07050
	Ранг / Rank	6	6	6	5	6
<i>CSF3</i>	Δ Сt, среднее арифметическое / Δ Сt, arithmetic mean	0,00006	0,07912	0,00009	0,00037	0,01991
	Ранг / Rank	11	7	11	9	7
<i>CCL20</i>	Δ Сt, среднее арифметическое / Δ Сt, arithmetic mean	0,00053	0,04921	0,00152	0,00130	0,01314
	Ранг / Rank	10	8	7	10	8
<i>CXCL5</i>	Δ Сt, среднее арифметическое / Δ Сt, arithmetic mean	0,00151	0,04374	0,00089	0,00559	0,01293
	Ранг / Rank	7	10	9	7	9
<i>CSF2</i>	Δ Сt, среднее арифметическое / Δ Сt, arithmetic mean	0,00055	0,04623	0,00103	0,00194	0,01244
	Ранг / Rank	9	9	8	8	10
<i>CXCL10</i>	Δ Сt, среднее арифметическое / Δ Сt, arithmetic mean	0,00005	0,00390	0,00007	0,00013	0,00108
	Ранг / Rank	12	11	12	12	11
<i>CCL5</i>	Δ Сt, среднее арифметическое / Δ Сt, arithmetic mean	0,00059	0,00055	0,00012	0,00016	0,00037
	Ранг / Rank	8	12	10	11	12

нительно других белков является недостаточным для стабильной детекции при помощи такого подхода. Как правило, даже при качественной пробоподготовке и удачных запусках масс-спектрометра в секретома удается определить лишь наиболее активно выделяемые цитокины (MIF, MCP-1/CCL2, GRO α /CXCL1 и IL-8/CXCL8), причем детекция последних двух из них также не является устойчивой. Определение концентрации цитокинов методом иммуноферментного анализа без обогащения культуральной среды (для вышеуказанных цитокинов) или после обогащения культуральной среды (для цитокинов с невысоким уровнем выделения) на вакуумном центрифужном концентраторе является достаточно дорогостоящим и требует предварительного скрининга для сужения спектра исследуемых цитокинов. В качестве скринингового метода нами было выбрано дот-блот-профилирование, позволяющее осуществлять полуколичественный анализ 109 цитокинов человек в результате хемиллюминесцентной детекции связывания антител, иммобилизованных на мембранах из нитроцеллюлозы или поливинилиденфторида, с добавляемыми антигенами в культуральной среде.

После шестикратного концентрирования среды в ней были определены 12 цитокинов, выделяемых эндотелиальными клетками вне зависимости от своего происхождения (клапаны сердца, артерии, вены, сосуды микроциркуляторного русла) и в отсутствие фетальной бычьей сыворотки (которая вносит в анализ определенную погрешность в

силу кросс-реактивности поликлональных антител для иммуноферментного анализа). При этом по совокупности анализа генной и белковой экспрессии данные цитокины можно было разделить на относительно высокоэкспрессируемые (MCP-1/CCL2, IL-8/CXCL8, GRO α /CXCL1, MIF, пентраксин-3), IL-6, который можно назвать условно пограничным между высокоэкспрессируемыми и низкоэкспрессируемыми цитокинами, и низкоэкспрессируемые (GM-CSF, G-CSF, RANTES/CCL5, MIP-3 α /CCL20, ENA-78/CXCL5, IP-10/CXCL10). Такая условная классификация может использоваться для предположения диапазона концентраций того или иного цитокина в культуральной среде от ЭК и определения ее необходимого разведения для соответствия получаемых измерений диапазону значений калибровочной кривой при выполнении иммуноферментного анализа или анализа с использованием флуоресцентно меченных и конъюгированных с антителами магнитных микросфер (технология xMAP).

Из всех исследованных линий ЭК наиболее активный синтез данных цитокинов на уровне транскрипции наблюдался в ЭК-ВГА; исключительно в культуральной среде от ЭК-ВГА были выявлены G-CSF, MIP-3 α /CCL20 и IP-10/CXCL10. Причины повышенной провоспалительной активации артериальных ЭК в сравнении с клапанными, венозными и микрососудистыми остаются неясными и требуют дальнейшего изучения. Не вполне ясно, характерна ли такая провоспалительная активация конкретно для ЭК-ВГА или в

Таблица 6. Относительный уровень экспрессии (Δ Ct, среднее арифметическое, нормализация на референсный ген *PECAMI1*) и ранг (ранжирование линий эндотелиальных клеток по относительному уровню экспрессии друг относительно друга) генов провоспалительных цитокинов (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL5*, *CXCL10*, *PTX3*) в первичных эндотелиальных клетках аортального клапана (ЭК-АК), внутренней грудной артерии (ЭК-ВГА), большой подкожной вены (ЭК-БПВ) и микрососудов подкожной жировой ткани (МСЭК) человека, инкубированных в бессывороточной культуральной среде в течение 24 часов после достижения конfluence. Средний ранг по всем указанным линиям (слева) и по ЭК-АК, ЭК-БПВ и МСЭК (справа)

Table 6. Relative expression level (Δ Ct, arithmetic mean, normalisation by the reference gene *PECAMI1*) and rank (ranking of the EC lines by the relative expression level) of the genes encoding pro-inflammatory cytokines (*IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*, *MIF*, *CCL5*, *CCL20*, *CSF2*, *CSF3*, *CXCL5*, *CXCL10*, *PTX3*) in primary human aortic valve endothelial cells (HAVEC), human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC), human saphenous vein endothelial cells (HSaVEC), and adipose tissue-derived microvascular endothelial cells (HMVEC) incubated in the serum-free cell culture medium for 24 hours after reaching the confluence. Average rank for all indicated EC lines (left) and HAVEC, HSaVEC, and HMVEC (right)

Ген / Gene	Δ Ct, среднее арифметическое по ЭК-АК, ЭК-ВГА, ЭК-БПВ и МСЭК / Δ Ct, arithmetic mean for HAVEC, HITAEC, HSaVEC, and HMVEC	Ранг / Rank	Ген / Gene	Δ Ct, среднее арифметическое по ЭК-АК, ЭК-БПВ и МСЭК / Δ Ct, arithmetic mean for HAVEC, HSaVEC, and HMVEC	Ранг / Rank
<i>CCL2</i>	1,13825	1	<i>CCL2</i>	0,78977	1
<i>CXCL8</i>	0,85648	2	<i>MIF</i>	0,48236	2
<i>CXCL1</i>	0,78415	3	<i>CXCL8</i>	0,20850	3
<i>MIF</i>	0,49607	4	<i>PTX3</i>	0,14635	4
<i>PTX3</i>	0,22441	5	<i>CXCL1</i>	0,13578	5
<i>IL6</i>	0,07050	6	<i>IL6</i>	0,02147	6
<i>CSF3</i>	0,01991	7	<i>CXCL5</i>	0,00266	7
<i>CCL20</i>	0,01314	8	<i>CSF2</i>	0,00118	8
<i>CXCL5</i>	0,01293	9	<i>CCL20</i>	0,00112	9
<i>CSF2</i>	0,01244	10	<i>CCL5</i>	0,00030	10
<i>CXCL10</i>	0,00108	11	<i>CSF3</i>	0,00017	11
<i>CCL5</i>	0,00037	12	<i>CXCL10</i>	0,00009	12

целом для артериальных ЭК; получение ответа на данный вопрос требует проведения дополнительного исследования, подразумевающего аналогичный анализ синтеза и выделения цитокинов в различных линиях артериальных ЭК (к примеру, ЭК коронарной артерии и ЭК внутренней грудной артерии). Альтернативным вариантом такого исследования может быть сравнение ЭК, выделенных из крови при ее прямом прижизненном заборе из различных артерий (аорты, коронарной, внутренней грудной, лучевой, сонной и легочной артерии); в то же время подтверждение артериального фенотипа данных клеточных популяций во взрослом возрасте является достаточно затруднительным и требует предварительного выявления некоего «безусловного» набора генов, специфичных для артериальных ЭК. Вероятнее всего, на первом этапе доказательство артериального фенотипа выделенных из крови ЭК потребует проведения сочетанного полнотранскриптомного и протеомного анализа артериальных, венозных и микрососудистых ЭК, выделенных из одного и того же пациента для исключения межиндивидуальной вариабельности. Это позволит объективно идентифицировать специфичные молекулярные сигнатуры артериальных ЭК, которые далее будет целесообразно искать в ЭК, прижизненно выделяемых из крови артерий различной локализации. Наконец, на последнем этапе в случае подтверждения артериального фенотипа данных ЭК будет целесообразным проведение анализа интенсивности транскрипции генов определенных в данном исследовании провоспалительных цитокинов и уровня их выделения.

В то же время полученные в данном исследовании результаты, свидетельствующие о повышенном уровне провоспалительной активации в ЭК-ВГА, соответствуют результатам, полученным нами ранее [15, 16]. Так, в исследовании по моделированию паракринных взаимодействий между ЭК-КА, ЭК-ВГА и ЭК-БПВ была выявлена повышенная экспрессия генов *CXCL8*, *ICAM1* и *SELE* в ЭК-ВГА по сравнению с ЭК-БПВ [15]. Проведенный после полнотранскриптомного секвенирования ЭК-КА и ЭК-ВГА биоинформатический анализ выявил гиперэкспрессию генов сигнальных путей воспаления (в том числе синтеза цитокинов и хемокинов) в ЭК-ВГА, но не в ЭК-КА [16]. При верификации вышеуказанных результатов анализа дифференциально экспрессированных молекулярных категорий в транскриптоме ЭК-КА и ЭК-ВГА в условиях ламинарного потока (воспроизводящего биомеханическое воздействие напряжения сдвига на ЭК) в ЭК-ВГА при помощи ОТ-кПЦР была выявлена повышенная экспрессия генов *IL6*, *CXCL8* и *CCL2* в сравнении с ЭК-КА [16]. В статических условиях при анализе генной экспрессии методом ОТ-кПЦР в ЭК-ВГА наблюдалось повышение экспрессии генов молекул клеточной адгезии (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*) и генов хемокинов (*CXCL8*, *CCL2*) [16]. При необходимо-

сти дополнительного подтверждения полученных результатов следует сказать, что данные о повышенной провоспалительной активации ЭК-ВГА в сравнении с ЭК-КА, ЭК-АК, ЭК-БПВ и МСЭК на данный момент выглядят достаточно убедительно.

Каких-либо уникальных для той или иной линии ЭК цитокинов в данном исследовании выявлено не было. Хотя G-CSF, MIP-3 α /CCL20 и IP-10/CXCL10 были детектированы только в культуральной среде от ЭК-ВГА, экспрессия генов *CSF3*, *CCL20* и *CXCL10* наблюдалась во всех линиях ЭК. Полученные результаты позволили сделать вывод о более выраженной провоспалительной активации ЭК-ВГА в сравнении с ЭК-АК, ЭК-БПВ и МСЭК, однако она обусловлена скорее количественными различиями (повышение экспрессии генов синтезируемых цитокинов), чем качественными (увеличение разнообразия выделяемых цитокинов). Следует отметить, что анализ корреляции концентраций цитокинов по результатам их измерения методом дот-блота не проводился вследствие нелинейности свечения при хемилюминесцентной схеме детекции (не позволяющей сравнивать абсолютные значения). Достаточно интересной задачей является анализ связи концентрации выделяемых провоспалительных цитокинов с иными функциональными параметрами ЭК (скоростью их пролиферации, параметрами барьерной функции и ангиогенной активностью); вероятно, такие взаимосвязи могут быть оценены при помощи добавления рекомбинантных цитокинов к культуре ЭК на соответствующих моделях.

К ограничениям данного исследования следует отнести: 1) выделение ЭК от различных доноров (это является объективным ограничением исследования, поскольку ЭК-АК и остальные линии ЭК едва ли могут быть получены от одного и того же донора); 2) отсутствие полнотранскриптомных данных для идентификации полного перечня выделяемых ЭК цитокинов (то есть некоторое исходное ограничение панели исследуемых маркеров); 3) культивирование ЭК в статических условиях, а не в условиях пульсирующего потока (что несколько ограничивает физиологическую релевантность исследования). Вместе с тем следует отметить, что дисфункциональное состояние эндотелия достаточно редко возникает при ламинарном потоке (который обычно моделируется в проточных системах типа *ibidi*); как правило, для его развития необходим осцилляторный поток (моделируемый посредством культивирования в статических условиях) или турбулентный поток (который достаточно сложно смоделировать *in vitro* в отношении требований к гидродинамическим параметрам).

В контексте устойчивости ЭК-ВГА к развитию атеросклероза следует отметить, что сигнальные пути воспаления (в том числе выделение цитокинов) способствуют пролиферации и миграции эндотелиальных клеток [21, 22], что с учетом характерного

для ВГА ламинарного потока может способствовать поддержанию целостности и физиологической проницаемости эндотелиального монослоя [23, 24]. Это частично пересекается с закономерностями пролиферации колониеформирующих эндотелиальных клеток (КФЭК), деление которых в первые дни после выделения из периферической крови в значительной степени зависит от моноцитов и лимфоцитов, выделяемых в градиенте фиколла вместе с клетками-предшественниками и секретирующими в микроокружение большое количество провоспалительных цитокинов [25, 26]. Проведенные нами ранее эксперименты показали, что при культивировании в условиях пульсирующего потока чистая культура моноцитов выделяет MIF, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, MIP-3 α /CCL20, ENA-78/CXCL5, PECAM1/CD31, ангиогенин, PAI-1, uPAR и тромбоспондин-1, а при патологическом воздействии к этому перечню добавляются GRO α /CXCL1 и IL-6. Вероятнее всего, мононуклеарная фракция моноцитов и лимфоцитов выделяет еще более широкий спектр цитокинов, способствующих пролиферации ЭК на изначальном этапе. Поскольку спектр провоспалительных цитокинов ЭК и моноцитов в значительной степени совпадает (MIF, IL-6, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, MIP-3 α /CCL20, GRO α /CXCL1, ENA-78/CXCL5), можно ожидать совместимости ЭК с моноцитарными цитокинами и положительного пролиферативного воздействия данных молекул на ЭК. В противном случае пролиферативная активность немногочисленных (а в ряде случаев даже и единичных) эндотелиальных клеток-предшественников (вследствие своего малого количества неспособных к выделению сколько-нибудь существенного количества цитокинов) подавлялась бы большим количеством провоспалительных цитокинов, выделяемых клетками мононуклеарной фракции периферической крови. Можно предположить, что на тканевом уровне собственная активация провоспалительных сигнальных путей ЭК обладает определенным положительным влиянием на поддержание их гомеостаза, однако постоянное воздействие связанных с коморбидными

состояниями биохимических факторов и выделение эндотелиальных цитокинов не только в микроокружение, а также и в системный кровоток приводят к индуцированной, избыточной провоспалительной активации ЭК и к патологическим последствиям.

Заключение

Полученные данные расширяют наши представления о спектре выделяемых первичными ЭК провоспалительных цитокинов (одновременно расширяя и ограничивая его MIF, IL-6, IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, MIP-3 α /CCL20, GM-CSF, G-CSF, GRO- α /CXCL1, ENA-78/CXCL5, IP-10/CXCL10, PTX3) и указывают на более выраженный провоспалительный статус ЭК-ВГА в сравнении с ЭК-АК, ЭК-БПВ и МСЭК. Последующие исследования могут быть направлены на сравнительный анализ синтеза и выделения провоспалительных цитокинов ЭК-ВГА и ЭК других артерий (к примеру ЭК-КА), а также на аналогичное сравнение между ЭК, выделяемыми прижизненно из крови аорты, коронарной, внутренней грудной, лучевой, сонной и легочной артерий.

Конфликт интересов

В.Е. Маркова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Д.К. Шишкова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.В. Фролов заявляет об отсутствии конфликта интересов. Л.С. Басович заявляет об отсутствии конфликта интересов. М.Ю. Синицкий заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.В. Синицкая заявляет об отсутствии конфликта интересов. Ю.О. Юрьева заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.И. Лазебная заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Г. Кутихин заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-65-00039 «Идентификация циркулирующего маркера провоспалительной дисфункции эндотелия в контексте гетерогенности эндотелиальных клеток», <https://rscf.ru/project/24-65-00039/>

Информация об авторах

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

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

Author Information Form

Markova Victoria E., MSc, 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

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

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

Басович Любовь Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории регенеративной биомедицины федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-9682-2874

Синицкий Максим Юрьевич, кандидат биологических наук заведующий лабораторией 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

Синицкая Анна Викторовна, 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** 0000-0002-4467-8732

Юрьева 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

Frolov Alexey V., MD, DSc, 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

Basovich Lyubov S., MSc, Junior Researcher, Laboratory for Regenerative Biomedicine, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-9682-2874

Sinitsky Maxim Yu., PhD, Head of the Laboratory for Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4824-2418

Sinitskaya Anna V., PhD, Senior Researcher, Laboratory for Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4467-8732

Yurieva 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, DSc, 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

Вклад авторов в статью

MBE – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение, анализ и интерпретация данных, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ШДК – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение, анализ и интерпретация данных, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ФАВ – вклад в концепцию и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

БЛС – получение, анализ и интерпретация данных, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Contribution Statement

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

SDK – contribution to the concept and design of the study, data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

FAV – contribution to the concept and design of the study, data analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

BLS – data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

СМО – получение, анализ и интерпретация данных, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

СAB – получение, анализ и интерпретация данных, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

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

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

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

СМУ – data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

САУ – data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

МЮ – data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

ЛА – data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016;248:97-109. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007.
- Gimbrone MA Jr, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620-36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
- Segers VFM, Bringmans T, De Keulenaer GW. Endothelial dysfunction at the cellular level in three dimensions: severity, acuteness, and distribution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2023;325(2):H398-H413. doi: 10.1152/ajpheart.00256.2023.
- Baaten CCFMJ, Vondenhoff S, Noels H. Endothelial Cell Dysfunction and Increased Cardiovascular Risk in Patients With Chronic Kidney Disease. *Circ Res*. 2023;132(8):970-992. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.123.321752.
- Liberalo L, Montecucco F, Tardif JC, Libby P, Camici GG. Inflammation: the role of inflammation in age-dependent cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2020;41(31):2974-2982. doi: 10.1093/eurheartj/ehz961.
- Müller L, Di Benedetto S. Inflammation, immunosenescence, and cardiovascular aging: insights into long COVID implications. *Front Cardiovasc Med*. 2024;11:1384996. doi: 10.3389/fcvm.2024.1384996.
- Greenspan LJ, Weinstein BM. 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.
- 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.
- Becker LM, Chen SH, Rodor J, de Rooij LPMH, Baker AH, 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.
- Rafii S, Butler JM, Ding BS. Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. *Nature*. 2016;529(7586):316-25. doi: 10.1038/nature17040.
- Peng Z, Shu B, Zhang Y, Wang M. Endothelial Response to Pathophysiological Stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(11):e233-e243. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312580.
- Шишкова Д.К., Фролов А.В., Маркова В.Е., Маркова Ю.О., Канонькина А.Ю., Лазебная А.И., Матвеева В.Г., Торгунакова Е.А., Кутихин А.Г. Современные подходы к моделированию дисфункции эндотелия и системному поиску ее циркулирующих маркеров. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2024. Т. 13. № S3. С. 173-190. doi: 10.17802/2306-1278-2024-13-3S-173-190.
- 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. Т. 13. № 3. С. 118-129. doi: 10.17802/2306-1278-2024-13-3-118-129.
- Богданов Л.А., Кошелев В.А., Мухамадияров Р.А., Канонькина А.Ю., Лазебная А.И., Кондратьев Е.А., Степанов А.Д., Кутихин А.Г. Современные подходы к идентификации клеточных маркеров дисфункции эндотелия. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2024. Т. 13. № S3. С. 191-207. doi: 10.17802/2306-1278-2024-13-3S-191-207.
- Shishkova D, Markova V, Sinitsky M, Tsepokina A, Frolov A, Zagorodnikov N, Bogdanov L, Kutikhin A. Co-Culture of Primary Human Coronary Artery and Internal Thoracic Artery Endothelial Cells Results in Mutually Beneficial Paracrine Interactions. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):8032. doi: 10.3390/ijms21218032.
- Frolov A, Lobov A, Kabilov M, Zainullina B, Tupikin A, Shishkova D, Markova V, Sinitskaya A, Grigoriev E, Markova Y, Kutikhin A. Multi-Omics Profiling of Human Endothelial Cells from the Coronary Artery and Internal Thoracic Artery Reveals Molecular but Not Functional Heterogeneity. *Int J Mol Sci*. 2023;24(19):15032. doi: 10.3390/ijms241915032.
- Kutikhin AG, Tupikin AE, Matveeva VG, Shishkova DK, Antonova LV, Kabilov MR, Velikanova EA. 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.
- Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P, Jung B, Lancellotti P, Otto CM, Pibarot P. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16006. doi: 10.1038/nrdp.2016.6.
- Vogel B, Claessen BE, Arnold SV, Chan D, Cohen DJ, Giannitsis E, Gibson CM, Goto S, Katus HA, Kerneis M, Kimura T, Kunadian V, Pinto DS, Shiomi H, Spertus JA, Steg PG, Mehran R. ST-segment elevation myocardial infarction. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):39. doi: 10.1038/s41572-019-0090-3.
- Kutikhin AG, Shishkova DK, Velikanova EA, Sinitsky MY, Sinitskaya AV, Markova VE. Endothelial Dysfunction in the Context of Blood-Brain Barrier Modeling. *J Evol Biochem Physiol*. 2022;58(3):781-806. doi: 10.1134/S0022093022030139.
- Jerka D, Bonowicz K, Piekarska K, Gokyer S, Derici US, Hindy OA, Altunay BB, 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.
- Lee HW, Shin JH, Simons M. Flow goes forward and cells step backward: endothelial migration. *Exp Mol Med*. 2022;54(6):711-719. doi: 10.1038/s12276-022-00785-1.
- Kraler S, Libby P, Evans PC, Akhmedov A, Schmiady MO, Reinehr M, Camici GG, Lüscher TF. Resilience of the Internal Mammary Artery to Atherogenesis: Shifting From Risk to Resistance to Address Unmet Needs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021;41(8):2237-2251. doi: 10.1161/ATVBAHA.121.316256.
- Otsuka F, Yahagi K, Sakakura K, Virmani R. Why is the mammary artery so special and what protects it from atherosclerosis? *Ann Cardiothorac Surg*. 2013;2(4):519-26. doi: 10.3978/j.issn.2225-319X.2013.07.06.
- Yan F, Liu X, Ding H, Zhang W. Paracrine mechanisms of endothelial progenitor cells in vascular repair. *Acta Histochem*. 2022;124(1):151833. doi: 10.1016/j.acthis.2021.151833.
- Chong MS, Ng WK, Chan JK. Concise Review: Endothelial Progenitor Cells in Regenerative Medicine: Applications and Challenges. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(4):530-8. doi: 10.5966/sctm.2015-0227.

REFERENCES

1. Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016;248:97-109. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007.
2. Gimbrone MA Jr, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620-36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
3. Segers VFM, Bringmans T, De Keulenaer GW. Endothelial dysfunction at the cellular level in three dimensions: severity, acuteness, and distribution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2023;325(2):H398-H413. doi: 10.1152/ajpheart.00256.2023.
4. Baaten CCFMJ, Vondenhoff S, Noels H. Endothelial Cell Dysfunction and Increased Cardiovascular Risk in Patients With Chronic Kidney Disease. *Circ Res*. 2023;132(8):970-992. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.123.321752.
5. Liberale L, Montecucco F, Tardif JC, Libby P, Camici GG. Inflamm-aging: the role of inflammation in age-dependent cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2020;41(31):2974-2982. doi: 10.1093/eurheartj/ehz961.
6. Müller L, Di Benedetto S. Inflammaging, immunosenescence, and cardiovascular aging: insights into long COVID implications. *Front Cardiovasc Med*. 2024;11:1384996. doi: 10.3389/fcvm.2024.1384996.
7. Greenspan LJ, Weinstein BM. 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.
8. 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.
9. Becker LM, Chen SH, Rodor J, de Rooij LPMH, Baker AH, 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.
10. Rafii S, Butler JM, Ding BS. Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. *Nature*. 2016;529(7586):316-25. doi: 10.1038/nature17040.
11. Peng Z, Shu B, Zhang Y, Wang M. Endothelial Response to Pathophysiological Stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(11):e233-e243. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312580.
12. Shishkova D.K., Frolov A.V., Markova V.E., Markova Yu.O., Kanonykina A.Yu., Lazebnaya A.I., Matveeva V.G., Torgunakova E.A., Kutikhin A.G. Modeling of endothelial dysfunction and search for its circulating biomarkers. *Kompleksnye problemy serdečno-sosudistykh zabolevanij = Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2024. Vol. 13. No. S3. P. 173-190. doi: 10.17802/2306-1278-2024-13-3S-173-190.
13. Shishkova D.K., Frolov A.V., Markova V.E., Markova Yu.O., Lazebnaya A.I., Kutikhin A.G. Improving methodology of endothelial cell research: synopsis and prospects. *Kompleksnye problemy serdečno-sosudistykh zabolevanij = Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2024. Vol. 13. No. 3. P. 118-129. doi: 10.17802/2306-1278-2024-13-3-118-129.
14. Bogdanov L.A., Koshelev V.A., Mukhamadiyarov R.A., Kanonykina A.Yu., Lazebnaya A.I., Kondratiev E.A., Stepanov A.D., Kutikhin A.G. Current approaches to the identification of cellular markers of endothelial dysfunction. *Kompleksnye problemy serdečno-sosudistykh zabolevanij = Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2024. Vol. 13. No. S3. P. 191-207. doi: 10.17802/2306-1278-2024-13-3S-191-207.
15. Shishkova D, Markova V, Sinitsky M, Tsepokina A, Frolov A, Zagorodnikov N, Bogdanov L, Kutikhin A. Co-Culture of Primary Human Coronary Artery and Internal Thoracic Artery Endothelial Cells Results in Mutually Beneficial Paracrine Interactions. *Int J Mol Sci*. 2020;21(21):8032. doi: 10.3390/ijms21218032.
16. Frolov A, Lobov A, Kabilov M, Zainullina B, Tupikin A, Shishkova D, Markova V, Sinitskaya A, Grigoriev E, Markova Y, Kutikhin A. Multi-Omics Profiling of Human Endothelial Cells from the Coronary Artery and Internal Thoracic Artery Reveals Molecular but Not Functional Heterogeneity. *Int J Mol Sci*. 2023;24(19):15032. doi: 10.3390/ijms241915032.
17. Kutikhin AG, Tupikin AE, Matveeva VG, Shishkova DK, Antonova LV, Kabilov MR, Velikanova EA. 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.
18. Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P, Iung B, Lancellotti P, Otto CM, Pibarot P. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16006. doi: 10.1038/nrdp.2016.6.
19. Vogel B, Claessen BE, Arnold SV, Chan D, Cohen DJ, Giannitsis E, Gibson CM, Goto S, Katus HA, Kerneis M, Kimura T, Kunadian V, Pinto DS, Shiomi H, Spertus JA, Steg PG, Mehran R. ST-segment elevation myocardial infarction. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):39. doi: 10.1038/s41572-019-0090-3.
20. Kutikhin AG, Shishkova DK, Velikanova EA, Sinitsky MY, Sinitskaya AV, Markova VE. Endothelial Dysfunction in the Context of Blood-Brain Barrier Modeling. *J Evol Biochem Physiol*. 2022;58(3):781-806. doi: 10.1134/S0022093022030139.
21. Jerka D, Bonowicz K, Piekarska K, Gokyer S, Derici US, Hindy OA, Altunay BB, 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.
22. Lee HW, Shin JH, Simons M. Flow goes forward and cells step backward: endothelial migration. *Exp Mol Med*. 2022;54(6):711-719. doi: 10.1038/s12276-022-00785-1.
23. Kraler S, Libby P, Evans PC, Akhmedov A, Schmiady MO, Reinhr M, Camici GG, Lüscher TF. Resilience of the Internal Mammary Artery to Atherosclerosis: Shifting From Risk to Resistance to Address Unmet Needs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021;41(8):2237-2251. doi: 10.1161/ATVBAHA.121.316256.
24. Otsuka F, Yahagi K, Sakakura K, Virmani R. Why is the mammary artery so special and what protects it from atherosclerosis? *Ann Cardiothorac Surg*. 2013;2(4):519-26. doi: 10.3978/j.issn.2225-319X.2013.07.06.
25. Yan F, Liu X, Ding H, Zhang W. Paracrine mechanisms of endothelial progenitor cells in vascular repair. *Acta Histochem*. 2022;124(1):151833. doi: 10.1016/j.acthis.2021.151833.
26. Chong MS, Ng WK, Chan JK. Concise Review: Endothelial Progenitor Cells in Regenerative Medicine: Applications and Challenges. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(4):530-8. doi: 10.5966/sctm.2015-0227.

Для цитирования: Маркова В.Е., Шишкова Д.К., Фролов А.В., Басович Л.С., Сеницкий М.Ю., Сеницкая А.В., Юрьева Ю.О., Лазебная А.И., Кутихин А.Г. Сравнительный анализ выделения провоспалительных цитокинов эндотелиальными клетками аортального клапана, внутренней грудной артерии, большой подкожной вены и микрососудов подкожной жировой ткани человека. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2025;14(4): 196-215. DOI: 10.17802/2306-1278-2025-14-4-196-215

To cite: Markova V.E., Shishkova D.K., Frolov A.V., Basovich L.S., Sinitsky M.Yu., Sinitskaya A.V., Yurieva Yu.O., Lazebnaya A.I., Kutikhin A.G. Synthesis of pro-inflammatory cytokines by human aortic valve, internal thoracic artery, saphenous vein, and adipose tissue-derived microvascular endothelial cells. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2025;14(4): 196-215. DOI: 10.17802/2306-1278-2025-14-4-196-215