

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА МОЛЕКУЛ, ВЫДЕЛЯЕМЫХ ПЕРВИЧНЫМИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОНАРНОЙ И ВНУТРЕННЕЙ ГРУДНОЙ АРТЕРИИ ЧЕЛОВЕКА В ФИЗИОЛОГИЧЕСКОМ И ДИСФУНКЦИОНАЛЬНОМ СОСТОЯНИИ

В.Е. Маркова¹, Д.К. Шишкова¹, А.Д. Степанов¹, А.В. Фролов¹, Ю.О. Юрьева¹, А.И. Лазебная¹, Е.А. Репкин², А.Г. Кутихин¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», бульвар имени академика Л.С. Барбараша, стр. 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002; ² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Университетская набережная, 7-9, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 199034

Основные положения

- Дисфункциональные эндотелиальные клетки характеризуются патологическим слушиванием рецепторных маркеров эндотелиального фенотипа, а также снижением выделения компонентов эндотелиальной базальной мембраны и субэндотелиального внеклеточного матрикса в культуральную среду.
- В сравнении с эндотелиальными клетками внутренней грудной артерии эндотелиальные клетки коронарной артерии отличаются повышенным выделением в культуральную среду интегринов и белков сигнальных путей активации и агрегации тромбоцитов, а также сниженным выделением компонентов базальной мембраны.
- В сравнении с эндотелиальными клетками коронарной артерии эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии характеризуются более высокой устойчивостью к воздействию пусковых факторов дисфункции эндотелия.

Цель	Провести сравнительный анализ содержания молекул различных функциональных классов в культуральной среде от первичных эндотелиальных клеток атерочувствительной коронарной артерии (ЭК-КА) и атерорезистентной внутренней грудной артерии (ЭК-ВГА), в том числе при их дисфункции.
Материалы и методы	В исследование были включены контрольные культуры ЭК-КА (n = 6) и ЭК-ВГА (n = 6) и культуры дисфункциональных ЭК-КА (n = 6) и ЭК-ВГА (n = 6), подвергшиеся воздействию кальципротеиновых частиц в бессывороточной культуральной среде в течение 24 часов. Далее было проведено осаждение выделенных в культуральную среду ЭК-КА и ЭК-ВГА белков ацетоном, триптический гидролиз белков до пептидов (10 мкг на образец), идентификация белков высокоэффективной жидкостной хроматографией с тандемной масс-спектрометрией и биоинформатический анализ относительного содержания маркеров эндотелиального фенотипа, компонентов эндотелиальной базальной мембраны и субэндотелиального внеклеточного матрикса, белков сигнальных путей ангиогенеза, активации и агрегации тромбоцитов, ответа на окислительный и эндоплазматический стресс. Анализ концентрации провоспалительных цитокинов в культуральной среде был проведен по технологии xMAP.
Результаты	Молекулярный профиль культуральной среды от дисфункциональных ЭК характеризовался повышенным содержанием растворимых форм эндотелиальных рецепторов, а также сниженным содержанием компонентов эндотелиальной базальной мембраны и субэндотелиального внеклеточного матрикса. В культуральной среде от ЭК-КА было выявлено повышенное содержание растворимых форм интегринов (свойственное для дисфункциональных ЭК) и белков сигнальных путей активации и агрегации тромбоцитов, а также сниженное содержание компонентов базальной мембраны.

	Воздействие первичных кальципротеиновых частиц индуцировало выделе- ние 12 и 5 провоспалительных цитокинов, а вторичных – 30 и 10 провоспа- лительных цитокинов в ЭК-КА и ЭК-ВГА соответственно.
Заключение	Качественный и количественный состав молекул, выделяемых ЭК-КА, более схож с таковым у дисфункциональных ЭК, в то время как ЭК-ВГА обладают более высокой устойчивостью к провоспалительной активации эндотелия.
Ключевые слова	Эндотелиальные клетки • Коронарная артерия • Внутренняя грудная артерия • Дисфункция эндотелия • Провоспалительные цитокины • Базальная мембрана • Внеклеточный матрикс

Поступила в редакцию: 08.08.2025; поступила после доработки: 25.09.2025; принята к печати: 08.10.2025

SECRETOME OF PRIMARY HUMAN CORONARY ARTERY
AND INTRNAL THORACIC ARTERY ENDOTHELIAL CELLS
AT PHYSIOLOGICAL STATE AND AT ENDOTHELIAL DYSFUNCTION

V.E. Markova¹, D.K. Shishkova¹, A.D. Stepanov¹, A.V. Frolov¹, Yu.O. Yurieva¹,
A.I. Lazebnaya¹, E.A. Repkin², 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 Saint Petersburg State University, 7-9,
Universitetskaya Embankment, Saint-Petersburg, Russian Federation, 199034

Highlights

- Dysfunctional endothelial cells are characterized by the pathological shedding of endothelial receptors markers and reduced release of endothelial basement membrane components and subendothelial extracellular matrix proteins into the cell culture medium.
- Primary human coronary artery endothelial cells demonstrate an elevated shedding of integrins, an increased production of platelet aggregation and activation components, and reduced release of basement membrane components into the cell culture medium as compared to human internal thoracic artery endothelial cells.
- Primary human internal thoracic artery endothelial cells have higher resistance to endothelial dysfunction triggers in comparison with human coronary artery endothelial cells.

Aim	To compare the secretome from intact and dysfunctional primary human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC).
Methods	Here we investigated the secretome of HCAEC and HITAEC treated with either PBS (intact ECs, n = 6 per EC line) or calcpotein particles (dysfunctional ECs, n = 6 per EC line) in the serum-free medium for 24 hours. To achieve this task, we performed acetone precipitation of proteins from the cell culture supernatant, tryptic digestion of proteins to peptides (15 µg per sample), protein identification by high-performance liquid chromatography-tandem mass-spectrometry, and bioinformatics analysis of endothelial phenotype markers, endothelial basement membrane components and subendothelial extracellular matrix proteins, angiogenesis pathways, platelet activation and aggregation pathways, and response to oxidative or endoplasmic reticulum stress. Concentration of pro-inflammatory cytokines in the cell culture supernatant was measured by multi-analyte profiling (xMAP).
Results	Cell culture supernatant from dysfunctional ECs had increased levels of endothelial cell receptor soluble forms and reduced quantities of endothelial basement membrane components and subendothelial extracellular matrix proteins. Cell culture supernatant from HCAEC contained increased levels of integrins (similar to dysfunctional ECs) and platelet activation and aggregation proteins, as well as reduced amount of basement membrane components. Treatment with primary calcpotein particles provoked the release of 12 and 5 pro-inflammatory cytokines, respectively. Treatment with secondary calcpotein particles induced production of 30 and 10 pro-inflammatory cytokines in HCAEC and HITAEC, respectively.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ

Conclusion	Secretome of HCAEC is more similar to dysfunctional ECs whilst HITAEC have higher resistance to pro-inflammatory endothelial activation.
Keywords	Endothelial cells • Coronary artery • Internal thoracic artery • Endothelial dysfunction • Pro-inflammatory cytokines • Basement membrane • Extracellular matrix

Received: 08.08.2025; received in revised form: 25.09.2025; accepted: 08.10.2025

Список сокращений

ВГА – внутренняя грудная артерия	МС – масс-спектрометрия
КА – коронарная артерия	ЭК – эндотелиальные клетки

Введение

Эндотелиальные клетки (ЭК), формирующие внутреннюю выстилку кровеносных сосудов, играют незаменимую роль в профилактике тромбоза, контроле тонуса сосудов для регуляции артериального давления и поддержании базального уровня провоспалительных цитокинов крови человека [1]. Выделяя ключевые ангиокринные факторы, в том числе молекулы с вазоактивным действием (монооксид азота, простаглицлин, эндотелин-1, тромбосан А2), ангиогенным и провоспалительным действием (ангиопоэтин-2, фактор привлечения моноцитов, макрофагальный и гранулоцитарный колониестимулирующие факторы, фактор ингибирования миграции макрофагов, интерлейкин-6, интерлейкин-8, интерлейкин-32 и хемокин CXCL1) и про-фибротическим действием (трансформирующий фактор роста-бета), оказывающие юкстакринное, паракринное и эндокринное действие на гладкие миоциты сосудов, перицитов и иммунных клеток, ЭК принимают активное участие в процессах ангиогенеза и регенерации (в том числе после ишемического повреждения) [1]. Недостаточность микроциркуляторного кровоснабжения, наблюдаемая при сахарном диабете [2], хронической болезни почек [3] или после ожогов III–IV степени [4] существенно замедляет восстановление биологических тканей после повреждений. Системные патологические процессы, в частности, ишемия [5], дислипидемия [6], ожирение [7], гипергликемия [8], азотемия [9], уремия [10] и гиперфосфатемия [11], распространенные у пациентов с мультифокальным атеросклерозом, сахарным диабетом и хронической болезнью почек, стимулируют патологическую активацию ЭК, которая сопровождается повышенным выделением провоспалительных цитокинов в кровоток и миграцией лейкоцитов в стенку кровеносных сосудов [1].

Провоспалительная дисфункция эндотелия способствует развитию хронического стерильного системного воспаления, патологическими последствиями чего являются: 1) артериальная гипертензия, сопровождающаяся сниженным выделением эндотелиальных вазодилататоров [12]; 2) повышение жесткости артерий путем запуска фенотипиче-

ского сдвига гладких миоцитов сосудов, что приводит к снижению сократимости артерий в сочетании с повышением синтеза коллагена и матрикс-деградирующих ферментов (матриксных металлопротеиназ, катепсинов и металлоэндопептидаз ADAM и ADAMTS) [13]; 3) синдром старческой астении, определяемый как ускорение биологического старения организма (избыточное снижение физических и когнитивных функций) в сравнении с хронологическим возрастом [14]. Специфические пусковые факторы дисфункции эндотелия (в частности, SARS-CoV-2) могут вызывать протромботическую дисфункцию эндотелия, характеризуемую повышением синтеза нерасщепленных высокомолекулярных мультимеров фактора фон Виллебранда и ингибитора активатора плазминогена в сочетании со снижением выделения урокиназного и тканевого активатора плазминогена, в совокупности вызывающую способствующую развитию тромбоза артерий, вен и сосудов микроциркуляторного русла и жизнеугрожающих тромботических осложнений [15]. Большое количество ЭК в организме человека (по различным оценкам, от 1 до 60 триллионов) и их непосредственный контакт с кровотоком подчеркивают патофизиологическую и клиническую значимость дисфункции эндотелия и необходимость своевременного изменения образа жизни и применения эффективных фармакологических подходов к ее лечению [16].

ЭК артерий, вен и сосудов микроциркуляторного русла характеризуются существенной молекулярной и функциональной гетерогенностью вследствие различных биомеханических условий (напряжение сдвига, циклическое растяжение и артериальное давление), различного парциального давления кислорода и углекислого газа в артериальной, венозной и капиллярной крови и различной жесткостью внеклеточного матрикса в различных типах сосудов [17]. Гетерогенность ЭК подразумевает использование различных линий ЭК для изучения патофизиологии соответствующих болезней системы кровообращения [17]: в частности, ЭК артерий активно применяются в исследованиях атеросклероза [18], ЭК вен – для изучения тромбоза [19], а ЭК сосудов микроциркуляторного русла –

для анализа этиологии и патогенеза нарушений микроциркуляции [20]. На фоне старения населения и повышения распространенности коморбидных состояний (сахарного диабета, хронической болезни почек и хронической обструктивной болезни легких) у пациентов с болезнями системы кровообращения [21] все более актуальной задачей также становится моделирование дисфункции эндотелия в артериях, подверженных развитию атеросклероза – к примеру, коронарной артерии (КА) и устойчивых к формированию атеросклеротических бляшек – к примеру, внутренней грудной артерии (ВГА). Предполагается, что устойчивость ВГА к развитию атеросклероза вызвана ламинарным кровотоком, исходно высоким базальным уровнем выделения вазодилататоров, устойчивостью к развитию окислительного стресса, низким уровнем провоспалительной и синтетической активности гладких миоцитов и относительно низким исходным содержанием коллагена в сосудистой стенке, что в совокупности обуславливает отсутствие атерогенной, фибротической и протеолитической активности [22].

Патологические последствия дисфункции эндотелия в значительной степени обусловлены изменением качественного и количественного состава молекул, выделяемых ЭК в микроокружение и системный кровоток [23]. По этой причине особый интерес представляет высокопроизводительное профилирование эндотелиального секрета в культуральной среде от интактных и дисфункциональных ЭК, а также от эндотелиальных клеток коронарной артерии (ЭК-КА) и внутренней грудной артерии (ЭК-ВГА). Наиболее чувствительными и специфичными методами для выполнения этой научной задачи являются ультравысокоэффективная жидкостная хроматография, совмещенная с tandemной масс-спектрометрией (УВЭЖХ-МС/МС), позволяющая провести объективный анализ совокупности выделяемых ЭК в культуральную среду белков, и применение конъюгированных с антителами флюоресцентно меченных магнитных микросфер (технология xMAP), позволяющее провести многопараметрический количественный анализ отдельных классов молекул (к примеру, провоспалительных цитокинов) в культуральной среде. В данном исследовании сочетание данных методик было использовано сначала для оценки профиля молекул, выделяемых контрольными и дисфункциональными ЭК, а затем – ЭК-КА и ЭК-ВГА. **Целью исследования** стал сравнительный анализ эндотелиального секрета в физиологических и патологических условиях, а также секрета ЭК атерочувствительной и атерорезистентной артерии.

Материалы и методы

Культивирование ЭК-КА и ЭК-ВГА

Первичные культуры ЭК-КА (300K-05a, Cell

Applications) и ЭК-ВГА (308K-05a, Cell Applications) культивировались во флаконах T-75 flasks (708003, Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd.) в соответствии с инструкциями производителя в среде EndoBoost (EB1, AppScience Products) до достижения конфлюэнтности. После этого ЭК-КА и ЭК-ВГА были рассеяны в 6-луночные планшеты (703001, Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd.) с использованием 0,25% раствора трипсина-ЭДТА (П043п, ПанЭко) и 10% фетальной бычьей сыворотки (1.1.6.1, Биолот) для ингибирования трипсина. Культивирование ЭК-КА и ЭК-ВГА в 6-луночных планшетах также осуществлялось в среде EndoBoost (EB1, AppScience Products) до достижения конфлюэнтности ($\approx 0.5 \times 10^6$ клеток на лунку). Непосредственно перед проведением экспериментов ЭК дважды промывали теплым ($\approx 37^\circ\text{C}$) раствором фосфатно-солевого буфера по Дульбекко без кальция и магния с $\text{pH} = 7,4$ (ФСБД, 1.2.4.7, Биолот) среду EndoBoost заменяли на бессывороточную среду EndoLife (EL1, AppScience Products). Культивирование ЭК-КА и ЭК-ВГА осуществляли в параллели.

Моделирование дисфункции эндотелия

Для моделирования дисфункции эндотелия с целью протеомного профилирования совокупности выделяемых ЭК в культуральную среду молекул (секрета) конфлюэнтные ($\approx 0,5 \times 10^6$ клеток на лунку 6-луночного планшета) культуры ЭК-КА и ЭК-ВГА в бессывороточной питательной среде EndoLife (EL1, AppScience Products) инкубировали со 100 мкл вторичных кальципротеиновых частиц (КПЧ-И) в дозе $0,6 \times 10^5$ частиц на 1 мл (25 мкг кальция на 1 мл) либо контрольного фосфатно-солевого буфера по Дульбекко (ФСБД) в течение 24 часов ($n = 6$ лунок на группу). После этого среду центрифугировали при $220 \times g$ (5804R, Eppendorf) для осаждения клеток, аликвотировали, центрифугировали при $2\,000 \times g$ (MiniSpin Plus, Eppendorf) для осаждения клеточного дебриса, переносили в новые пробирки и замораживали при -80°C .

Для моделирования дисфункции эндотелия с целью последующего мультиплексного анализа провоспалительных цитокинов конфлюэнтные ($\approx 0,5 \times 10^6$ клеток на лунку 6-луночного планшета) культуры ЭК-КА и ЭК-ВГА в бессывороточной питательной среде EndoLife (EL1, AppScience Products) инкубировали со 100 мкл первичных кальципротеиновых частиц (КПЧ-С) или вторичных кальципротеиновых частиц (КПЧ-И) в дозе $0,6 \times 10^5$ частиц на 1 мл (25 мкг кальция на 1 мл) либо контрольного фосфатно-солевого буфера по Дульбекко (ФСБД) в течение 24 часов ($n = 3$ лунок на группу). После этого среду центрифугировали при $220 \times g$ (5804R, Eppendorf) для осаждения клеток, аликвотировали, центрифугировали при $2\,000 \times g$ (MiniSpin Plus, Eppendorf) для осаждения клеточного дебриса, пе-

реносили в новые пробирки и замораживали при -80°C . Синтез кальципротеиновых частиц осуществляли в соответствии с ранее опубликованным протоколом [18, 23].

Ультравысокоэффективная жидкостная хроматография, совмещенная с tandemной масс-спектрометрией (УВЭЖХ-МС/МС)

После осаждения белка ацетоном (добавление 300 мкл бессывороточной культуральной среды к 1 200 мкл ацетона, 650501, Sigma-Aldrich) осадок белка ресуспендировали в мочеvine (8 моль/л, U5128, Sigma-Aldrich), разведенной в бикарбонате аммония (50 ммоль/л, 09830, Sigma-Aldrich). Концентрацию белка измеряли на флуориметре Qubit 4 (Q33238, Thermo Fisher Scientific) с использованием соответствующего набора QuDye Protein Quantification Kit (25102, Lumiprobe) в соответствии с инструкцией производителя. Образцы белка (10 мкг) инкубировали с дитиотреитолом (5 ммоль/л, D0632, Sigma-Aldrich) в течение 1 часа при 37°C с последующей инкубацией в 2-йодацетамиде (15 ммоль/л) в течение 30 минут при комнатной температуре без доступа света (I1149, Sigma-Aldrich). Далее образцы разводили в 7 объемах бикарбоната аммония (50 ммоль/л), добавляли 200 нг трипсина (соотношение трипсина к белку 1:50, VA9000, Promega) и инкубировали в течение 16 часов при 37°C . Затем пептиды замораживали при -80°C на 1 час и обессоливали при помощи хроматографических наконечников (Tips-RPS-M.T2.200.96, Affinisep) в соответствии с инструкцией производителя, используя метанол (1880092500, Sigma-Aldrich), ацетонитрил (1000291000, Sigma-Aldrich) и муравьиную кислоту в концентрации 0,1% (33015, Sigma-Aldrich). Обессоленные пептиды высушивали при помощи вакуумного центрифужного концентратора (HyperVAC-LITE, Gyrozen Co., Ltd.) в течение 3 часов и растворяли в 20 мкл муравьиной кислоты в концентрации 0,1% (1000291000, Sigma-Aldrich) для последующего протеомного анализа.

Для протеомного анализа методом УВЭЖХ-МС/МС с ионной подвижностью (нанопоточный хроматограф для хроматографического разделения nanoElute и масс-спектрометр TimsToF Pro, Bruker Daltonics) использовали ≈ 500 нг пептидов. УВЭЖХ проводили с использованием хроматографической колонки Bruker FIFTEEN (C18-фаза, длина 150 мм, внутренний диаметр 0,075 мм, диаметр ложа 1,9 мкм, диаметр пор 120 Å, Bruker Daltonics, Germany) в градиенте вода/ацетонитрил в присутствии 0,1% муравьиной кислоты при температуре 50°C со скоростью потока 400 нл/мин и температурой колонки в 50°C (фаза А – вода с 0,1% муравьиной кислотой, фаза В – ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислотой). До загрузки каждого образца колонку промывали ее 4 объемами. Масс-спектрометр

использовали в PASEF-режиме положительной полярности дата-зависимой tandemной масс-спектрометрии с временем PASEF-цикла 0,5 секунды. Молекулы с ионной подвижностью от 0,85 до 1,30 1/K0 аккумулировали в ячейке измерения ионной подвижности, после чего поочередно передавали в квадруполь-времяпролетный масс-спектрометр, синхронизированный с ячейкой измерения ионной подвижности, где проходила фрагментация наиболее обильных ионов в режиме автоматической tandemной масс-спектрометрии (МС/МС). Для фрагментации использовали ионы не менее чем с двумя зарядами в диапазоне m/z от 100 до 1 800.

Биоинформатический анализ

Идентификацию белков проводили с использованием программ FragPipe (версия 21.1), MSFragger (версия 4.1), IonQuant (версия 1.10.27) и Philosopher (версия 5.1.0) с использованием операционной системы Windows 10 с версией Java 11.0.9.1 и архитектурой AMD64. Поиск проводили в соответствии с базовым техпроцессом LFQ-MBR DDA с калибровкой и оптимизацией параметров. Идентификацию проводили с использованием базы данных SwissProt (загружена 10.08.2024; 20,468 белков), отфильтрованной по белкам человека, а также с использованием исходного списка контаминантов программы FragPipe. Достоверными считали идентификации белков и пептидов со средней долей ложных отклонений гипотез (false discovery rate, FDR) $< 1\%$ и $< 0,1\%$ соответственно. Затем из анализа были исключены белки, имеющие менее 2 уникальных пептидов. После получения информации о количестве спектров, по которым была осуществлена идентификация обнаруженных белков в различных образцах, и площади соответствующих пиков проводили анализ полученных данных.

Статистический анализ масс-спектрометрических данных проводили в программной среде R (версия 4.3.2). В качестве метрики для анализа содержания белков в R была использована площадь хроматографических пиков, по которым была осуществлена идентификация обнаруженных белков в различных образцах. Для обеспечения надлежащего качества данных были использованы исключительно белки, определенные не менее чем в 70% образцов. Отсутствующие данные (missing data) заполняли с использованием метода k -ближайших соседей при помощи пакета “impute” (версия 1.78.0).

После анализа совокупности белковых молекул, представленных в культуральной среде от контрольных и дисфункциональных ЭК, для анализа было выбрано 1 249 белков, экспрессированных не менее чем в 70% образцов. Далее 10% (125) белков с наибольшей кратностью изменения в каждой из этих групп были проанализированы на предмет их отношения к дифференциально экспрессированным

биоинформатическим категориям. Аналогичный анализ был проведен для ЭК-КА и ЭК-ВГА. Анализ дифференциально экспрессированных биоинформатических категорий был проведен с использованием баз данных Gene Ontology и Reactome, а также поискового инструмента DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>). После удаления биоинформатических категорий с < 5 дифференциально экспрессированными белками также проводили фильтрацию по EASE score ≤ 0,05 и FDR-скорректированному значению p ≤ 0,05.

Измерение концентрации провоспалительных цитокинов в культуральной среде от ЭК по технологии xMAP

Для оценки концентрации провоспалительных цитокинов был использован метод их измерения посредством конъюгированных с антителами флюоресцентно меченных магнитных микросфер (так называемая технология многопараметрического анализа xMAP – Multi-Analyte Profiling). Указанный анализ был выполнен с использованием набора MILLIPLEX Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (HCYTMAg-60K-PX41, Merck) в соответствии с инструкцией производителя. Для анализа 41 провоспалительного цитокина было использовано по 25 мкл каждого образца бессывороточной культуральной среды.

Результаты

Хромато-масс-спектрометрический анализ выделенных из культуральной среды белков после их триптического гидролиза позволил выделить 1 249 молекул, секретируемых контрольными и дисфункциональными ЭК. Из этих 1 249 молекул 28 были отнесены к маркерам эндотелиального фенотипа, 21 – к компонентам эндотелиальной базальной мембраны, 66 – к прочим компонентам субэндотелиального внеклеточного матрикса, 6 – к белкам метаболизма монооксида азота (NO), 48 – к белкам сигнальных путей ангиогенеза, 80 – к белкам сигнальных путей активации и агрегации тромбоцитов и свертывания крови, 16 и 17 соответственно – к белкам ответа на окислительный и эндоплазматический стресс. Для определения молекулярного профиля провоспалительной активации эндотелия в первую очередь был проведен анализ относительного уровня белковых маркеров эндотелиального фенотипа в культуральной среде от ЭК, инкубированных в стандартных условиях (контрольных ЭК) и в присутствии кальципротеиновых частиц (дисфункциональных ЭК). В качестве метрики уровня экспрессии при хромато-масс-спектрометрическом анализе было использовано среднее значение площади пика в контрольной группе (mean peak area). Повышение или снижение считалось значимым при изменении кратности изменения экспрессии в

1,5 раза (то есть с кратностью изменения экспрессии ≥ 1,50 или ≤ 0,67).

В культуральной среде как от контрольных, так и от дисфункциональных ЭК отмечался высокий относительный уровень (средняя площадь пика ≥ 750,000) растворимых форм фактора фон Виллебранда (VWF), рецептора к белку С (PROCR), межклеточной молекулы клеточной адгезии 2 (ICAM2), молекулы клеточной адгезии клеток меланомы (MCAM) и VE-кадгерина (CDH5) (табл. 1). Относительный уровень остальных растворимых

Таблица 1. Ранжирование уровней белковых маркеров эндотелиального фенотипа (отражаемых средним значением площади хроматографического пика) в культуральной среде от контрольных и дисфункциональных ЭК относительно друг друга при анализе данных высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией
Table 1. Levels of endothelial cell markers (indicated by mean chromatographic peak area at high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) in the cell culture supernatant from control and dysfunctional ECs. Head-to-head comparison of the cell culture supernatant from intact and dysfunctional ECs. Mean chromatographic peak area ranking

Белок / Protein	Средняя площадь хроматографического пика в контрольных ЭК / Mean chromatographic peak area in the intact ECs	Белок / Protein	Средняя площадь хроматографического пика в дисфункциональных ЭК / Mean chromatographic peak area in dysfunctional ECs
VWF	1 693 335	VWF	1 205 888
PROCR	984 319	MCAM	1 166 022
ICAM2	981 348	PROCR	1 134 508
MCAM	828 829	ICAM2	931 041
CDH5	813 076	CDH5	775 906
PECAM1	245 693	PECAM1	277 225
CAVIN2	207 455	CAVIN2	225 092
CAVIN1	186 650	CLEC14A	196 011
TIE1	169 579	TIE1	142 454
ESM1	138 302	CAVIN1	139 241
CLEC14A	125 027	ITGB1	124 361
NRP1	117 760	BSG	119 219
ESAM	97 464	F11R	118 789
NRP2	95 766	ITGA5	116 574
ITGB1	88 596	NRP1	103 968
BSG	76 763	EDF1	88 327
F11R	70 551	ITGA2	88 030
EDF1	64 758	KDR	86 919
ITGA2	62 168	ESAM	80 584
TJP1	58 216	ENG	79 823
KDR	57 912	TEK	72 489
ITGA5	57 865	EPHB4	60 794
ENG	54 140	EPHB2	54 173
EPHB4	48 846	TJP1	46 992
TEK	45 601	PTPRB	44 018
ICAM1	29 896	ICAM1	36 531
EPHB2	29 455	ESM1	33 071
PTPRB	20 513	NRP2	25 251

Примечание: Здесь и далее в табл. 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 16, 17, 18: ЭК – эндотелиальные клетки.
Note: Here and further in the table. 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 16, 17, 18: ECs – endothelial cells.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ

форм эндотелиальных маркеров был кратно ниже (средняя площадь пика $\leq 300,000$), при в среде и от контрольных, и от дисфункциональных ЭК отмечалась достаточно высокая экспрессия (средняя площадь пика от 100,000 до 300,000) белков тромбоцитарно-эндотелиальной молекулы клеточной адгезии (PECAM1), кавина-1 (CAVIN1), кавина-2 (CAVIN-2), рецептора к ангиопоэтинам TIE1, белка межклеточной адгезии CLEC14A и рецептора к фактору роста эндотелия сосудов (VEGF) нейропилина-1 (NRP1). В среде от контрольных ЭК средняя площадь пика от 100,000 до 300,000 также детектировалась для дерматансульфатного протеогликана ESM1 (эндокана), в среде от дисфункциональных ЭК – для бета-1 и альфа-5 субъединиц интегрина (ITGB1 и ITGA5), басигина (BSG) и белка плотных контактов F11R (JAM-A/CD321, табл. 1). Следует отметить, что в составе секрета ЭК содержалось более 60% ранее идентифицированных маркеров эндотелиального фенотипа (28 из 45, 62%, табл. 1).

Расчет кратности изменения экспрессии при сравнительном анализе экспрессии белковых маркеров эндотелиального фенотипа показал повышение уровня растворимых форм сосудистой эндотелиальной белковой тирозинфосфатазы (PTPRB), альфа-5, альфа-2 и бета-1 субъединиц интегринов (ITGA5, ITGA2 и ITGB1), рецептора 2 В-типа к эфринам (EPHB2), белка плотных контактов F11R (JAM-A), рецептора к ангиопоэтину-1 (TEK/CD202B), басигина (BSG), рецептора к фактору роста эндотелия сосудов (VEGFR2), эндоглина (ENG) и молекулы клеточной адгезии клеток меланомы (MCAM) в среде от дисфункциональных ЭК в сравнении с контрольными (табл. 2). В то же время сниженная экспрессия растворимых форм в среде от дисфункциональных ЭК отмечалась всего лишь для трех маркеров эндотелиального фенотипа: фактора фон Виллебранда (VWF), рецептора к VEGF нейропилина-2 (NRP2) и секретируемого ЭК протеогликана эндокана (ESM1, табл. 2).

Далее был проведен анализ экспрессии иных белков семейств, к которым относились маркеры эндотелиального фенотипа (интегринов, клаудинов, молекул семейств JAM и ZO, кадгеринов, коннексинов, эфринов и их рецепторов, рецепторов семейства Notch, ангиопоэтинов и ангиопоэтин-подобных белков). В значительной степени это были белки межклеточных контактов и контактов ЭК с эндотелиальной базальной мембраной (интегрины) и субэндотелиальным внеклеточным матриксом (белки плотных контактов окклюдин, клаудины и молекулы семейств JAM и ZO, белки адгезивных контактов кадгерины) и белки щелевых контактов (коннексины), а также белки ангиогенных молекул (эфрины и их рецепторы, рецепторы семейства Notch, ангиопоэтины, ангиопоэтин-подобные белки). В отличие от транскриптома (в котором наблю-

далась экспрессия 44 подобных белков), в эндотелиальном секретоме было выявлено всего лишь 5 белков данной группы: эфрины (EFNB1, EFNB2, EFNA1), кадгерин-13 (CDH13) и белок плотных контактов TJP2 (ZO-2), из которых кратно изменением экспрессии $\geq 1,5$ в патологическом секретоме обладали EFNB1 и EFNB2 (табл. 3).

При сравнении маркеров эндотелиального фенотипа в среде от ЭК-КА и ЭК-ВГА у ЭК-КА было выявлено повышение кратности изменения экспрессии бета-1, альфа-2 и альфа-5 субъединицы интегринов (ITGB1, ITGA2 и ITGA5) более чем в 1,5 раза (табл. 4). В среде от ЭК-ВГА было вы-

Таблица 2. Ранжирование белковых маркеров эндотелиального фенотипа по кратности изменения их содержания (отражаемого средним значением площади хроматографического пика) в культуральной среде от контрольных и дисфункциональных ЭК при анализе данных высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией

Table 2. Levels of endothelial cell markers (indicated by mean chromatographic peak area at high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) in the cell culture supernatant from control and dysfunctional ECs. Fold change ranking

Белок / Protein	Средняя площадь хроматографического пика в контрольных ЭК / Mean chromatographic peak area in the intact ECs	Средняя площадь хроматографического пика в дисфункциональных ЭК / Mean chromatographic peak area in dysfunctional ECs	Кратность изменения / Fold change
PTPRB	20 513	44 018	2,15
ITGA5	57 865	116 574	2,01
EPHB2	29 455	54 173	1,84
F11R	70 551	118 789	1,68
TEK	45 601	72 489	1,59
CLEC14A	125 027	196 011	1,57
BSG	76 763	119 219	1,55
KDR	57 912	86 919	1,50
ENG	54 140	79 823	1,47
ITGA2	62 168	88 030	1,42
MCAM	828 829	1 166 022	1,41
ITGB1	88 596	124 361	1,40
EDF1	64 758	88 327	1,36
EPHB4	48 846	60 794	1,24
ICAM1	29 896	36 531	1,22
PROCR	984 319	1 134 508	1,15
PECAM1	245 693	277 225	1,13
CAVIN2	207 455	225 092	1,09
CDH5	813 076	775 906	0,95
ICAM2	981 348	931 041	0,95
NRP1	117 760	103 968	0,88
TIE1	169 579	142 454	0,84
ESAM	97 464	80 584	0,83
TJP1	58 216	46 992	0,81
CAVIN1	186 650	139 241	0,75
VWF	1 693 335	1 205 888	0,71
NRP2	95 766	25 251	0,26
ESM1	138 302	33 071	0,24

явлено аналогичное повышение уровня растворимых форм белка плотных контактов F11R (JAM-A/CD321), рецептора 4 В-типа к эфринам (EPHB4) и сосудистой эндотелиальной белковой тирозинфосфатазы (PTPRB), а также фактора фон Виллебранда (VWF), эндотелиальной дифференцировки (EDF1) и кавина-2 (CAVIN2, табл. 4). При этом все три белка с повышенным уровнем в среде от ЭК-КА (ITGB1, ITGA2 и ITGA5, табл. 4) были гиперэкспрессированы также и в среде от дисфункциональных ЭК (табл. 2), что позволило предположить патологический секреторный фенотип у ЭК-КА.

Далее в среде от контрольных и дисфункциональных ЭК была проанализировано содержание компонентов эндотелиальной базальной мембраны, являющейся субстратом для прикрепления ЭК в кровеносных сосудах. Иерархия компонентов эндотелиальной базальной мембраны в среде от контрольных и дисфункциональных ЭК была сопоставимой: наибольшим содержанием характеризовались остеонектин (SPARC), перлекан (HSPG2), фибронектин (FN1), аннексин А2 (ANXA2), субъединицы ламинина (LAMB1, LAMC1, LAMA4), тканевой ингибитор металлопротеиназ (TIMP1) и коллаген IV типа (COL4A1, табл. 5).

Последующий анализ выявил более чем 1,5-кратное снижение кратности содержания большинства компонентов эндотелиальной базальной мембраны: субъединиц коллагена IV типа (COL4A1 и COL4A2), субъединиц ламинина (LAMA4, LAMA5, LAMB1, LAMB2, LAMC1), тканевого ингибитора металлопротеиназ (TIMP1), субъединицы коллагена VI типа (COL6A1), пероксидазина (PXDN), нидогена-1 (NID1), агрина (AGRN), перлекана (HSPG2), фибронектина (FN1), остеонектина (SPARC), фибулина-1 (FBN1) и гомо-

лога лизилоксидазы (LOXL2) в среде от дисфункциональных ЭК, при этом аналогичное повышение экспрессии наблюдалось только для аннексина А2 (ANXA2, табл. 6).

Отличительной особенностью ЭК-ВГА было повышенное выделение ими в среду широкого спектра компонентов эндотелиальной базальной мембраны: перлекана (HSPG2), нидогена (NID1), бета-2-субъединицы ламинина (LAMB2), коллагена IV типа (COL4A1), мультимерина-2 (MMRN2) и аннексина А2 (ANXA2) в сравнении с ЭК-КА (табл. 7). Четверо из данных молекул также были гиперэкспрессированы в среде от контрольных ЭК в сравнении с

Таблица 3. Ранжирование белков, родственных эндотелиальным маркерам, по кратности изменения их содержания (отражаемого средним значением площади хроматографического пика) в культуральной среде от контрольных и дисфункциональных ЭК при анализе данных высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией

Table 3. Levels of proteins cognate to endothelial cell markers (indicated by mean chromatographic peak area at high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) in the cell culture supernatant from control and dysfunctional ECs. Fold change ranking

Белок / Protein	Средняя площадь хроматографического пика в контрольных ЭК / Mean chromatographic peak area in the intact ECs	Средняя площадь хроматографического пика в дисфункциональных ЭК / Mean chromatographic peak area in dysfunctional ECs	Кратность изменения / Fold change
EFNB1	101 503	234 555	2,31
EFNB2	25 090	38 557	1,54
CDH13	224 733	293 657	1,31
EFNA1	31 792	41 283	1,30
TJP2	52 566	54 231	1,03

Таблица 4. Ранжирование маркеров эндотелиального фенотипа по кратности изменения их содержания (отражаемого средним значением площади хроматографического пика) в культуральной среде от ЭК-КА и ЭК-ВГА при анализе данных высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией

Table 4. Levels of endothelial cell markers (indicated by mean chromatographic peak area at high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) in the cell culture supernatant from HCAEC and HITAEC. Fold change ranking

Белок / Protein	Средняя площадь хроматографического пика в ЭК-КА / Mean chromatographic peak area in HCAEC	Средняя площадь хроматографического пика в ЭК-ВГА / Mean chromatographic peak area in HITAEC	Кратность изменения / Fold change
ITGB1	118 580	68 608	1,73
ITGA2	81 698	49 148	1,66
ITGA5	72 491	48 115	1,51
KDR	71 771	48 672	1,47
PROCR	1 150 724	873 383	1,32
EPHB2	34 396	26 160	1,31
ICAM1	34 875	26 576	1,31
PECAM1	282 831	220 934	1,28
BSG	83 029	72 586	1,14
ENG	54 983	53 579	1,03
ESAM	98 521	96 759	1,02
NRP2	96 120	95 530	1,01
MCAM	817 877	836 131	0,98
TJP1	57 065	58 983	0,97
TIE1	163 293	173 771	0,94
CDH5	728 540	869 433	0,84
CAVIN1	166 800	199 884	0,83
NRP1	104 220	126 787	0,82
ICAM2	815 501	1 091 912	0,75
CLEC14A	102 468	140 067	0,73
TEK	37 343	51 106	0,73
ESM1	113 142	155 075	0,73
F11R	54 678	81 134	0,67
EDF1	49 221	75 116	0,66
CAVIN2	155 643	241 997	0,64
EPHB4	30 934	60 788	0,51
VWF	1 475 833	1 838 336	0,48
PTPRB	6 207	30 050	0,21

Примечание: Здесь и далее в табл. 4, 7, 10, 13, 15: ЭК-ВГА – эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии; ЭК-КА – эндотелиальные клетки коронарной артерии.
Note: Here and further in the table. 4, 7, 10, 13, 15: HCAEC – human coronary artery endothelial cells; HITAEC – human internal thoracic artery endothelial cells.

дисфункциональными (табл. 6). В сравнении с ЭК-ВГА ЭК-КА характеризовались повышением выделения в среду фибронектина (FN1) и альфа-5-субъединицы ламинина (LAMA5, табл. 7).

По аналогии с маркерами эндотелиального фенотипа и компонентами эндотелиальной базальной мембраны, иерархия компонентов субэндотелиального внеклеточного матрикса в среде от контрольных и дисфункциональных ЭК не обладала большими различиями, хотя их относительное содержание характеризовалось несколько большей вариабельностью (табл. 8). В частности, в среде от контрольных и дисфункциональных ЭК была наиболее выражена экспрессия тромбоспондина-1 (THBS1), фактора роста соединительной ткани (CCN2), просапозина (PSAP), EGF-содержащего фибулиноподобного белка внеклеточного матрикса (EFEMP1), ингибитора активатора плазминогена (SERPINE1), фактора фон Виллебранда (VWF), галектина-1

Таблица 5. Ранжирование уровней компонентов эндотелиальной базальной мембраны (отражаемых средним значением площади хроматографического пика) в культуральной среде от контрольных и дисфункциональных ЭК относительно друг друга при анализе данных высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией
Table 5. Levels of endothelial basement membrane components (indicated by mean chromatographic peak area at high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) in the cell culture supernatant from control and dysfunctional ECs. Head-to-head comparison of the cell culture supernatant from intact and dysfunctional ECs. Mean chromatographic peak area ranking

Белок / Protein	Средняя площадь хроматографического пика в контрольных ЭК / Mean chromatographic peak area in the intact ECs	Белок / Protein	Средняя площадь хроматографического пика в дисфункциональных ЭК / Mean chromatographic peak area in dysfunctional ECs
SPARC	3 819 368	ANXA2	1 934 463
HSPG2	2 667 961	SPARC	675 414
FN1	1 146 277	HSPG2	507 952
ANXA2	991 812	TIMP1	233 695
LAMB1	400 560	FN1	218 012
LAMC1	387 931	LAMB1	213 284
LAMA4	360 303	LAMC1	190 043
TIMP1	355 431	LAMA4	187 372
LOXL2	319 988	DAG1	124 564
COL4A1	169 751	COL4A1	109 548
FBN1	162 619	COL18A1	104 793
NID1	162 124	MMRN2	75 661
COL18A1	151 663	COL4A2	72 703
AGRN	122 995	LAMB2	69 495
LAMB2	120 715	LAMA5	64 503
DAG1	111 620	NID1	55 069
COL4A2	110 357	LOXL2	51 881
LAMA5	100 875	COL6A1	28 494
PXDN	73 855	FBN1	26 689
COL6A1	65 322	PXDN	26 338
MMRN2	63 146	AGRN	24 511

(LGALS1), белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IGFBP7) и катепсина В (табл. 8).

Анализ кратности изменения содержания компонентов субэндотелиального внеклеточного матрикса выявил снижение содержания 30 из них более чем в 1,5 раза (из них 21 – более чем в 2 раза), что составило 45% (30/66) от их общего количества в среде от дисфункциональных ЭК (табл. 9). В частности, среда от дисфункциональных ЭК характеризовалась снижением кратности изменения содержания дерматансульфатного протеогликана эндокана (ESM1), лизилгидроксилаз PLOD1 и PLOD3, фактора роста соединительной ткани (CCN2), кислого гликопротеина кластерина (CLU), тромбоспондина-1, ассоциированного с микрофибриллами белка MFAP2, а также протеогликанов бигликана (BGN) и тестикана (SPOCK1) более чем в 4 раза (табл. 9). При этом содержание 10 из 66 (15%) компонентов субэндотелиального внеклеточного матрикса, детектированных в среде от дисфункциональных ЭК,

Таблица 6. Ранжирование компонентов эндотелиальной базальной мембраны по кратности изменения их содержания (отражаемого средним значением площади хроматографического пика) в культуральной среде от контрольных и дисфункциональных ЭК при анализе данных высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией
Table 6. Levels of endothelial basement membrane components (indicated by mean chromatographic peak area at high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) in the cell culture supernatant from control and dysfunctional ECs. Fold change ranking

Белок / Protein	Средняя площадь хроматографического пика в контрольных ЭК / Mean chromatographic peak area in the intact ECs	Средняя площадь хроматографического пика в дисфункциональных ЭК / Mean chromatographic peak area in dysfunctional ECs	Кратность изменения / Fold change
ANXA2	991 812	1934463	1,95
MMRN2	63 146	75 661	1,20
DAG1	111 620	124 564	1,12
COL18A1	151 663	104 793	0,69
COL4A2	110 357	72 703	0,66
TIMP1	355 431	233 695	0,66
COL4A1	169 751	109 548	0,65
LAMA5	100 875	64 503	0,64
LAMB2	120 715	69 495	0,58
LAMB1	400 560	213 284	0,53
LAMA4	360 303	187 372	0,52
LAMC1	387 931	190 043	0,49
COL6A1	65 322	28 494	0,44
PXDN	73 855	26 338	0,36
NID1	162 124	55 069	0,34
AGRN	122 995	24 511	0,20
HSPG2	2 667 961	507 952	0,19
FN1	1 146 277	218 012	0,19
SPARC	3 819 368	675 414	0,18
FBN1	162 619	26 689	0,16
LOXL2	319 988	51 881	0,16

Таблица 7. Ранжирование компонентов эндотелиальной базальной мембраны по кратности изменения их содержания (отражаемое средним значением площади хроматографического пика) в культуральной среде от ЭК-КА и ЭК-ВГА при анализе данных высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией

Table 7. Levels of endothelial basement membrane components (indicated by mean chromatographic peak area at high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) in the cell culture supernatant from human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC). Fold change ranking

Белок / Protein	Средняя площадь хроматографического пика в ЭК-КА / Mean chromatographic peak area in HCAEC	Средняя площадь хроматографического пика в ЭК-ВГА / Mean chromatographic peak area in HITAEC	Кратность изменения / Fold change
FN1	1 574 492	860 800	1,83
LAMA5	126 242	83 964	1,50
AGRN	133 417	116 046	1,15
TIMP1	379 193	339 589	1,12
COL6A1	68 797	63 005	1,09
LAMC1	386 572	388 837	0,99
PXDN	69 779	76 572	0,91
LAMB1	375 920	416 986	0,90
COL4A2	101 870	116 016	0,88
DAG1	101 721	118 219	0,86
LOXL2	286 205	342 510	0,84
FBN1	138 392	178 771	0,77
SPARC	3 005 674	4 361 831	0,69
LAMA4	283 360	411 599	0,69
COL18A1	118 029	174 085	0,68
HSPG2	1 978 068	3 127 890	0,63
MMRN2	46 803	74 041	0,63
ANXA2	731 348	1 165 454	0,63
NID1	115 842	192 978	0,60
LAMB2	78 071	149 144	0,52
COL4A1	105 515	212 576	0,50

Таблица 8. Ранжирование уровней компонентов субэндотелиального внеклеточного матрикса (отражаемых средним значением площади хроматографического пика) в культуральной среде от контрольных и дисфункциональных ЭК относительно друг друга при анализе данных высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией

Table 8. Levels of non-basement membrane extracellular matrix components (indicated by mean chromatographic peak area at high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) in the cell culture supernatant from control and dysfunctional ECs. Head-to-head comparison of the cell culture supernatant from intact and dysfunctional ECs. Mean chromatographic peak area ranking

Белок / Protein	Средняя площадь хроматографического пика в контрольных ЭК / Mean chromatographic peak area in the intact ECs	Белок / Protein	Средняя площадь хроматографического пика в дисфункциональных ЭК / Mean chromatographic peak area in dysfunctional ECs
THBS1	5 104 409	PSAP	2 084 666
CCN2	3 558 935	LGALS1	1 885 024
PSAP	2 199 679	SERPINE1	1 483 797
EFEMP1	2 157 048	VWF	1 205 888
SERPINE1	1 773 705	CTSB	999 101
VWF	1 693 335	EFEMP1	991 556

LGALS1	1 635 998	IGFBP7	916 971
IGFBP7	1 543 318	THBS1	888 317
CTSB	1 097 110	CCN2	833 944
HSP90AA1	1 086 666	HNRNPM	785 334
CLU	1 055 289	PKM	686 261
MMRN1	798 002	SERPINB6	595 128
PKM	755 842	HSP90AA1	520 524
BGN	642 459	AHSG	461 143
TIMP2	535 023	A2M	434 820
MFAP2	509 302	CSTB	424 446
HNRNPM	456 228	MMRN1	424 319
CALR	450 180	SERPINB9	383 521
SERPINB6	432 663	S100A10	374 676
AHSG	424 745	CDH13	293 657
TGM2	421 110	TGM2	216 607
SERPINB9	373 323	CALR	215 122
MMP2	367 433	CLU	198 612
CCN1	353 902	APOA1	198 065
CSTB	331 126	TIMP2	197 218
A2M	276 896	CTSD	196 529
SPOCK1	247 715	CLEC14A	196 011
HSP90B1	238 672	ANXA1	187 914
CDH13	224 733	CTSC	186 829
CTSD	193 478	MMP2	182 026
CTSZ	190 059	LGALS3	176 413
HDGF	189 903	SERPINB1	167 911
TINAGL1	185 142	PZP	142 805
CTSC	153 905	ANXA5	137 497
COL5A2	151 595	CTSZ	132 521
S100A10	144 898	CCN1	130 483
PLOD1	142 325	HDGF	110 882
ESM1	138 302	HSP90B1	100 349
LTBP2	126 945	COL5A2	93 659
SERPINH1	125 921	HRNR	85 855
CLEC14A	125 027	SERPINH1	82 820
ANXA1	121 678	SERPINC1	82 800
LGALS3	120 034	ITIH2	75 107
SERPINB1	117 864	MFAP2	71 693
PLOD3	109 869	BGN	70 249
POSTN	96 176	TINAGL1	59 218
ANXA5	94 890	FLG	58 856
ITIH2	93 370	CTSL	57 548
CTSL	85 235	BCAM	52 363
SERPINB8	84 198	SERPINB8	50 953
APOA1	84 082	LTBP2	48 524
PLOD2	71 970	LGALS9	47 929
HRNR	57 985	ANXA6	47 124
ANXA6	53 599	S100A6	44 218
LOX	51 830	ICAM1	36 531
BCAM	48 058	PLOD1	33 605
PZP	47 686	ESM1	33 071
ECM1	44 988	PLOD2	32 949
ABI3BP	44 114	CTSH	31 086
S100A6	38 630	LOX	30 855
SERPINC1	37 323	ITIH4	29 794
ICAM1	29 896	ECM1	27 698
CTSH	27 325	POSTN	27 526
ITIH4	24 171	SPOCK1	20 440
FLG	22 147	PLOD3	15 812
LGALS9	21 735	ABI3BP	11 741

было повышенным более чем в 1,5 раза (табл. 9). К таким компонентам относился целый ряд кислых белков: кальций-связывающий белок S100A10, антитромбин III, альфа-2-микроглобулин и аннексин A1, а также белок PZP, филаггрин (FLG), аполипопротеин A1 и галектин-9 (табл. 9).

По аналогии с компонентами эндотелиальной базальной мембраны, в среде от ЭК-ВГА наблюдалось повышенное выделение 14 компонентов субэндотелиального внеклеточного матрикса в сравнении со средой от ЭК-КА (табл. 10). В их число входили 7 белков (CCN1, CCN2, EFEMP1, MFAP2, бигликан, мультимерин-1 и кластерин), также гиперэкспрессированные в среде от ЭК в физиологическом состоянии (табл. 9). Схожий молекулярный профиль наблюдался в среде от ЭК-КА, которые характеризовались повышенным выделением 15

компонентов субэндотелиального внеклеточного матрикса в сравнении с ЭК-ВГА (табл. 10). При этом 9 из гиперэкспрессированных в среде от ЭК-КА белков (лизилгидроксилазы PLOD2 и PLOD3, лизиоксидаза, тестикан-1, белок ECM1, периостин, кальретикулин, матриксная металлопротеиназа-2 и коллаген V типа) совпадали с гиперэкспрессированными в среде от контрольных ЭК (табл. 9).

Учитывая актуальность синтеза монооксида азота (NO) для физиологии эндотелия, далее было проанализировано содержание компонентов данного сигнального пути в среде от контрольных и дисфункциональных ЭК (табл. 11). Тем не менее, в исследованных образцах было выявлено лишь 6 таких белков, один из которых (кавин-1) был гиперэкспрессирован в среде от дисфункциональных ЭК, а два (белок теплового шока HSP90AA1 и каль-

Таблица 9. Ранжирование компонентов субэндотелиального внеклеточного матрикса по кратности изменения их содержания (отражаемого средним значением площади хроматографического пика) в культуральной среде от контрольных и дисфункциональных ЭК при анализе данных высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией
Table 9. Levels of non-basement membrane extracellular matrix components (indicated by mean chromatographic peak area at high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) in the cell culture supernatant from control and dysfunctional ECs. Fold change ranking

Белок / Protein	Средняя площадь хроматографического пика в контрольных ЭК / Mean chromatographic peak area in the intact ECs	Средняя площадь хроматографического пика в дисфункциональных ЭК / Mean chromatographic peak area in dysfunctional ECs	Кратность изменения / Fold change
PZP	47 686	142 805	2,99
FLG	22 147	58 856	2,66
S100A10	144 898	374 676	2,59
APOA1	84 082	198 065	2,36
SERPINC1	37 323	82 800	2,22
LGALS9	21 735	47 929	2,21
HNRNPM	456 228	785 334	1,72
A2M	276 896	434 820	1,57
CLEC14A	125 027	196 011	1,57
ANXA1	121 678	187 914	1,54
HRNR	57 985	85 855	1,48
LGALS3	120 034	176 413	1,47
ANXA5	94 890	137 497	1,45
SERPINB1	117 864	167 911	1,42
SERPINB6	432 663	595 128	1,38
CDH13	224 733	293 657	1,31
CSTB	331 126	424 446	1,28
ITIH4	24 171	29 794	1,23
ICAM1	29 896	36 531	1,22
CTSC	153 905	186 829	1,21
LGALS1	1 635 998	1 885 024	1,15
S100A6	38 630	44 218	1,14
CTSH	27 325	31 086	1,14
BCAM	48 058	52 363	1,09
AHSG	424 745	461 143	1,09
SERPINB9	373 323	383 521	1,03
CTSD	193 478	196 529	1,02
PSAP	2 199 679	2 084 666	0,95
CTSB	1 097 110	999 101	0,91
PKM	755 842	686 261	0,91
ANXA6	53 599	47 124	0,88
SERPINE1	1 773 705	1 483 797	0,84
ITIH2	93 370	75 107	0,80
VWF	1 693 335	1 205 888	0,71
CTSZ	190 059	132 521	0,70
CTSL	85 235	57 548	0,68
SERPINH1	125 921	82 820	0,66
COL5A2	151 595	93 659	0,62
ECM1	44 988	27 698	0,62
SERPINB8	84 198	50 953	0,61
LOX	51 830	30 855	0,60
IGFBP7	1 543 318	916 971	0,59
HDGF	189 903	110 882	0,58
MMRN1	798 002	424 319	0,53
TGM2	421 110	216 607	0,51
MMP2	367 433	182 026	0,50
HSP90AA1	1 086 666	520 524	0,48
CALR	450 180	215 122	0,48
EFEMP1	2 157 048	991 556	0,46
PLOD2	71 970	32 949	0,46
HSP90B1	238 672	100 349	0,42
LTBP2	126 945	48 524	0,38
CCN1	353 902	130 483	0,37
TIMP2	535 023	197 218	0,37
TINAGL1	185 142	59 218	0,32
POSTN	96 176	27 526	0,29
ABI3BP	44 114	11 741	0,27
ESM1	138 302	33 071	0,24
PLOD1	142 325	33 605	0,24
CCN2	3 558 935	833 944	0,23
CLU	1 055 289	198 612	0,19
THBS1	5 104 409	888 317	0,17
PLOD3	109 869	15 812	0,14
MFAP2	509 302	71 693	0,14
BGN	642 459	70 249	0,11
SPOCK1	247 715	20 440	0,08

модулин) – в среде от контрольных ЭК (табл. 11).
Анализ белков сигнальных путей ангиогенеза, являющегося одной из важнейших функций ЭК, показал приблизительно равное количество анги-

огенных молекул с повышенным содержанием в среде от дисфункциональных (12) и от контрольных (14) ЭК (табл. 12). Большинство (10 из 12) компонентов с повышенным содержанием в среде

Таблица 10. Ранжирование компонентов субэндотелиального внеклеточного матрикса по кратности изменения их содержания (отражаемого средним значением площади хроматографического пика) в культуральной среде от ЭК-КА и ЭК-ВГА при анализе данных высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной массе-спектрометрией
Table 10. Levels of non-basement membrane extracellular matrix components (indicated by mean chromatographic peak area at high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) in the cell culture supernatant from human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC). Fold change ranking

Белок / Protein	Средняя площадь хроматографического пика в ЭК-КА / Mean chromatographic peak area in HCAEC	Средняя площадь хроматографического пика в ЭК-ВГА / Mean chromatographic peak area in HITAEC	Кратность изменения / Fold change
CTSL	84 252	85 890	0,98
TIMP2	527 549	540 005	0,98
HSP90AA1	1 048 442	1 112 149	0,94
CTSZ	179 675	196 981	0,91
ANXA1	113 661	127 023	0,89
SERPINE1	1 629 711	1 869 701	0,87
VWF	1 475 833	1 838 336	0,80
SERPINB9	324 506	405 868	0,80
CDH13	190 222	247 739	0,77
CTSB	927 546	1 210 153	0,77
IGFBP7	1 298 718	1 706 386	0,76
CLEC14A	102 468	140 067	0,73
ESM1	113 142	155 075	0,73
THBS1	4 122 806	5 758 811	0,72
ANXA5	75 275	107 967	0,70
SERPINB6	342 158	493 000	0,69
S100A6	30 486	44 060	0,69
LGALS3	94 602	136 989	0,69
PKM	594 878	863 151	0,69
SERPINC1	29 222	42 724	0,68
HNRNPM	345 002	530 379	0,65
FLG	16 450	25 945	0,63
CCN1	242 331	428 283	0,57
EFEMP1	1 470 726	2 614 596	0,56
CCN2	2 421 339	4 317 333	0,56
CTSH	17 390	33 949	0,51
SERPINB1	72 837	147 882	0,49
MFAP2	289 407	655 899	0,44
BCAM	26 698	62 298	0,43
LGALS1	899 492	2 127 002	0,42
BGN	253 507	901 760	0,28
MMRN1	269 704	1 150 200	0,23
S100A10	45 739	211 004	0,22
CLU	193 233	1 629 994	0,12

PLOD2	132 936	31 325	4,24
ITIH2	153 554	53 247	2,88
AHSG	695 113	244 501	2,84
LGALS9	34 162	13 450	2,54
SPOCK1	369 930	166 239	2,23
ECM1	67 181	30 192	2,23
LOX	76 143	35 621	2,14
APOA1	119 512	60 462	1,98
POSTN	135 510	69 953	1,94
CALR	630 520	329 953	1,91
ITIH4	32 938	18 327	1,80
MMP2	484 885	289 131	1,68
ANXA6	68 813	43 456	1,58
COL5A2	192 183	124 536	1,54
PLOD3	139 161	90 342	1,54
A2M	341 661	233 720	1,46
LTBP2	156 352	107 340	1,46
CSTB	403 262	283 036	1,42
TGM2	507 619	363 438	1,40
SERPINH1	151 538	108 844	1,39
HSP90B1	281 698	209 988	1,34
ICAM1	34 875	26 576	1,31
SERPINB8	94 806	77 126	1,23
TINAGL1	198 553	176 202	1,13
ABI3BP	47 174	42 074	1,12
HRNR	61 165	55 865	1,09
CTSD	200 105	189 060	1,06
PSAP	2 258 364	2 160 555	1,05
CTSC	156 922	151 894	1,03
PLOD1	142 584	142 152	1,00
HDGF	189 633	190 083	1,00

Таблица 11. Ранжирование компонентов сигнального пути метаболизма монооксида азота (NO) по кратности изменения их содержания (отражаемого средним значением площади хроматографического пика) в культуральной среде от контрольных и дисфункциональных ЭК при анализе данных высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной массе-спектрометрией
Table 11. Levels of nitric oxide metabolism proteins (indicated by mean chromatographic peak area at high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) in the cell culture supernatant from control and dysfunctional ECs. Fold change ranking

Белок / Protein	Средняя площадь хроматографического пика в контрольных ЭК / Mean chromatographic peak area in the intact ECs	Средняя площадь хроматографического пика в дисфункциональных ЭК / Mean chromatographic peak area in dysfunctional ECs	Кратность изменения / Fold change
CAV1	178 838	360 365	2,02
DDAH1	249 135	330 175	1,33
LYPLA1	76 257	70 846	0,93
NMT1	58 195	53 768	0,92
HSP90AA1	1 086 666	520 524	0,48
CALM1	1 543 213	691 639	0,45

ORIGINAL STUDIES

Таблица 12. Ранжирование белков сигнальных путей ангиогенеза по кратности изменения их содержания (отражаемого средним значением площади хроматографического пика) в культуральной среде от контрольных и дисфункциональных ЭК при анализе данных высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией

Table 12. Levels of angiogenic proteins (indicated by mean chromatographic peak area at high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) in the cell culture supernatant from control and dysfunctional ECs. Fold change ranking

Белок / Protein	Средняя площадь хроматографического пика в контрольных ЭК / Mean chromatographic peak area in the intact ECs	Средняя площадь хроматографического пика в дисфункциональных ЭК / Mean chromatographic peak area in dysfunctional ECs	Кратность изменения / Fold change
PTPRB	20 513	44 018	2,15
CAV1	178 838	360 365	2,02
ITGA5	57 865	116 574	2,01
ANXA2	991 812	1 934 463	1,95
MMP14	80 488	153 530	1,91
EPHB2	29 455	54 173	1,84
HMOX1	57 802	98 923	1,71
ANPEP	804 781	1 292 402	1,61
TEK	45 601	72 489	1,59
BSG	76 763	119 219	1,55
PLXND1	26 947	41 215	1,53
KDR	57 912	86 919	1,50
CXCL8	84 781	119 695	1,41
MCAM	828 829	1 166 022	1,41
ITGB1	88 596	124 361	1,40
NRCAM	87 092	117 063	1,34
EFNA1	31 792	41 283	1,30
EPHB4	48 846	60 794	1,24
MMRN2	63 146	75 661	1,20
AIMP1	167 278	200 214	1,20
BCAM	48 058	52 363	1,09
WARS1	169 310	182 448	1,08
CALD1	292 390	291 362	1,00
ERAP1	54 497	50 364	0,92
ATP5F1B	85 045	78 488	0,92
CLIC4	275 553	248 917	0,90
MYH9	765 578	678 520	0,89
NRP1	117 760	103 968	0,88
TIE1	169 579	142 454	0,84
SERPINE1	1 773 705	1 483 797	0,84
FLNA	977 747	815 615	0,83
CCL2	180 676	139 472	0,77
COL18A1	151 663	104 793	0,69
ACTG1	4 667 804	3 176 610	0,68
COL4A2	110 357	72 703	0,66
MYDGF	293 043	190 214	0,65
ECM1	44 988	27 698	0,62
ROBO4	125 562	75 835	0,60
IGFBP7	1 543 318	916 971	0,59
YWHAZ	2 093 775	1 228 401	0,59
NCL	328 116	184 180	0,56
MMP2	367 433	182 026	0,50
PXDN	73 855	26 338	0,36
NRP2	95 766	25 251	0,26
ESM1	138 302	33 071	0,24
CCN2	3 558 935	833 944	0,23
HSPG2	2 667 961	507 952	0,19
FN1	1 146 277	218 012	0,19

Таблица 13. Ранжирование компонентов сигнальных путей ангиогенеза по кратности изменения их содержания (отражаемого средним значением площади хроматографического пика) в культуральной среде от ЭК-КА и ЭК-ВГА при анализе данных высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией

Table 13. Levels of angiogenic proteins (indicated by mean chromatographic peak area at high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) in the cell culture supernatant from human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC). Fold change ranking

Белок / Protein	Средняя площадь хроматографического пика в ЭК-КА / Mean chromatographic peak area in HCAEC	Средняя площадь хроматографического пика в ЭК-ВГА / Mean chromatographic peak area in HITAEC	Кратность изменения / Fold change
ECM1	67 181	30 192	2,23
FN1	1 574 492	860 800	1,83
MMP14	108 699	61 681	1,76
ITGB1	118 580	68 608	1,73
MMP2	484 885	289 131	1,68
ITGA5	72 491	48 115	1,51
KDR	71 771	48 672	1,47
NRCAM	105 826	74 602	1,42
ANPEP	965 390	697 708	1,38
EPHB2	34 396	26 160	1,31
BSG	83 029	72 586	1,14
HMOX1	62 072	54 955	1,13
AIMP1	173 537	163 106	1,06
ERAP1	56 125	53 411	1,05
CLIC4	278 453	273 620	1,02
NRP2	96 120	95 530	1,01
MCAM	817 877	836 131	0,98
WARS1	166 626	171 099	0,97
CALD1	287 229	295 831	0,97
MYH9	738 720	783 483	0,94
TIE1	163 293	173 771	0,94
FLNA	927 651	1 011 144	0,92
PXDN	69 779	76 572	0,91
MYDGF	276 183	304 282	0,91
NCL	303 054	344 823	0,88
ATP5F1B	78 513	89 400	0,88
COL4A2	101 870	116 016	0,88
SERPINE1	1 629 711	1 869 701	0,87
YWHAZ	1 878 904	2 237 022	0,84
NRP1	104 220	126 787	0,82
ACTG1	4 089 299	5 053 474	0,81
IGFBP7	1 298 718	1 706 386	0,76
CAV1	149 238	198 572	0,75
TEK	37 343	51 106	0,73
ESM1	113 142	155 075	0,73
COL18A1	118 029	174 085	0,68
HSPG2	1 978 068	3 127 890	0,63
MMRN2	46 803	74 041	0,63
ANXA2	731 348	1 165 454	0,63
CCN2	2 421 339	4 317 333	0,56
EPHB4	30 934	60 788	0,51
ROBO4	73 953	159 968	0,46
PLXND1	15 021	34 897	0,43
BCAM	26 698	62 298	0,43
PTPRB	6 207	30 050	0,21
EFNA1	8 895	47 057	0,19
CXCL8	8 076	135 918	0,06

от дисфункциональных ЭК обладало про-ангиогенной активностью (CAV1, ITGA5, ANXA2, MMP14, EPHB2, HMOX1, ANPEP, TIE2, BSG, KDR), оставшиеся 2 имели анти-ангиогенное действие (PTPRB, PLXND1, табл. 12). Аналогичное распределение про-ангиогенных (MYDGF, ECM1, IGFBP7, MMP-2, PXDN, NRP2, ESM1, CCN2, HSPG2, FN1) и анти-ангиогенных (COL4A2, ROBO4, NCL) компонентов наблюдалось и в среде от контрольных ЭК (табл. 12).

В среде от ЭК-КА наблюдалось повышенное

выделение 6 ангиогенных молекул, почти все из которых (ECM1, MMP14, MMP2, ITGB1, ITGA5) обладали про-ангиогенным действием (табл. 13). В среде от ЭК-ВГА детектировали 11 ангиогенных молекул, 7 из которых имели про-ангиогенные эффекты, а 4 – анти-ангиогенные (табл. 13).

Далее был проведен сравнительный анализ содержания компонентов сигнальных путей активации и агрегации тромбоцитов, а также свертывания крови в контрольных и дисфункциональных ЭК (табл. 14). В среде от дисфункциональных ЭК на-

Таблица 14. Ранжирование белков сигнальных путей активации и агрегации тромбоцитов и свертывания крови по кратности изменения их содержания (отражаемого средним значением площади хроматографического пика) в культуральной среде от контрольных и дисфункциональных ЭК при анализе данных высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией
Table 14. Levels of platelet aggregation, platelet activation, and blood coagulation proteins (indicated by mean chromatographic peak area at high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) in the cell culture supernatant from control and dysfunctional ECs. Fold change ranking

Белок / Protein	Средняя площадь хроматографического пика в контрольных ЭК / Mean chromatographic peak area in the intact ECs	Средняя площадь хроматографического пика в дисфункциональных ЭК / Mean chromatographic peak area in dysfunctional ECs	Кратность изменения / Fold change
CD59	323 148	1 839 455	5,69
CD63	33 960	91 565	2,70
VTI1B	14 702	38 665	2,63
TMSB4X	6 480 679	16 707 120	2,58
APOA1	84 082	198 065	2,36
TF	52 237	120 949	2,32
SERPINC1	37 323	82 800	2,22
PLAU	11 034	24 253	2,20
ALB	366 130	778 712	2,13
PLAUR	31 412	58 980	1,88
ACTB	2 597 121	4 707 533	1,81
SOD1	1 268 800	2 299 391	1,81
PEAR1	24 792	44 449	1,79
PPIA	3 792 438	6 676 717	1,76
HSPB1	343 546	600 900	1,75
WDR1	843 773	1 463 565	1,73
PFN1	2 920 484	4 915 364	1,68
PABPC4	32 042	52 157	1,63
AP3B1	24 600	38 999	1,59
A2M	276 896	434 820	1,57
CYRIB	60 221	91 167	1,51
ANXA5	94 890	137 497	1,45
ITGA2	62 168	88 030	1,42
GNAI2	32 902	45 124	1,37
ALB	5 194 866	6 963 660	1,34
TAGLN2	970 318	1 272 827	1,31
GRB2	56 627	71 508	1,26
VCL	312 404	386 907	1,24
ITIH4	24 171	29 794	1,23
CD9	178 262	217 392	1,22
ALDOA	1 137 341	1 357 342	1,19
PTPN11	40 213	47 707	1,19
CFL1	2 164 607	2 547 591	1,18
LAMP2	213 185	250 225	1,17
PROCR	984 319	1 134 508	1,15
PECAM1	245 693	277 225	1,13
CD109	141 870	154 883	1,09
AHSG	424 745	461 143	1,09
CSRP1	358 180	375 285	1,05
CAP1	378 468	384 049	1,01
FAM3C	71 530	71 924	1,01
CRK	149 981	145 221	0,97
PSAP	2 199 679	2 084 666	0,95
AK3	55 768	52 123	0,93
MYH9	765 578	678 520	0,89
OLA1	63 898	53 593	0,84
RHOA	59 230	49 649	0,84
SERPINE1	1 773 705	1 483 797	0,84
FLNA	977 747	815 615	0,83
ACTN4	640 291	521 929	0,82
HBB	724 625	583 990	0,81
GNG12	71 509	54 922	0,77
ACTN1	1 538 816	1 124 174	0,73
VWF	1 693 335	1 205 888	0,71
GNB2	57 373	40 690	0,71
ACTG1	4 667 804	3 176 610	0,68
RAC1	95 928	63 962	0,67
MAPK1	107 880	71 563	0,66
TIMP1	355 431	233 695	0,66
TLN1	212 789	136 055	0,64
GNB1	118 167	74 666	0,63
APLP2	71 818	44 237	0,62
ECM1	44 988	27 698	0,62
CLIC1	422 113	257 369	0,61
MANF	166 321	102 225	0,61
QSOX1	308 488	182 272	0,59
YWHAZ	2 093 775	1 228 401	0,59
PDIA3	695 116	377 186	0,54
TUBA4A	183 198	97 673	0,53
MMRN1	798 002	424 319	0,53
HSPA5	377 677	178 888	0,47
CALM1	1 543 213	691 639	0,45
CALU	304 784	127 340	0,42
APP	386 374	133 548	0,35
FN1	1 146 277	218 012	0,19
CLU	1 055 289	198 612	0,19
SPARC	3 819 368	675 414	0,18
THBS1	5 104 409	888 317	0,17
SRGN	367 032	35 388	0,10

ОРИГИНАЛЬНЫЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ

блюдалось повышенное содержание 21 белков данных сигнальных путей, включая растворимую форму рецептора защиты ЭК от комплемента CD59, протромботический тканевой фактор (тромбопластин) и антитромботические белки антитромбин III (SERPINC1), урокиназный активатор плазминогена (PLAU) и растворимую форму соответствующего рецептора (PLAUR), а также растворимую форму тромбоцитарно-эндотелиального рецептора (PEAR1, табл. 14). В среде от контрольных ЭК отмечалось повышенное содержание 23 белков данных сигнальных путей, включая протромботические белки MAPK1, талин (TLN1), PDIA3, мульти-

мерин-1 (MMRN1), кальмодулин (CALM1), фибронектин (FN1) и тромбоспондин-1 (TSP1, табл. 14). В среде от ЭК-КА наблюдалось большее количество гиперэкспрессированных белков сигнальных путей активации и агрегации тромбоцитов, а также свертывания крови (13 молекул) в сравнении с 7 белками в ЭК-ВГА (табл. 15). Из молекул с повышенным содержанием в среде от ЭК-КА явным протромботическим эффектом обладали три белка (тканевой фактор, фибронектин и ITIH4), анти-тромботическим эффектом – один белок (APLP2, табл. 15). Из молекул с повышенным содержанием в среде от ЭК-ВГА один белок (муль-

Таблица 15. Ранжирование белков сигнальных путей активации и агрегации тромбоцитов и свертывания крови по кратности изменения их содержания (отражаемого средним значением площади хроматографического пика) в культуральной среде от ЭК-КА и ЭК-ВГА при анализе данных высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией
Table 15. Levels of platelet aggregation, platelet activation, and blood coagulation proteins (indicated by mean chromatographic peak area at high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) in the cell culture supernatant from human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC). Fold change ranking

Белок / Protein	Средняя площадь хроматографического пика в ЭК-КА / Mean chromatographic peak area in HCAEC	Средняя площадь хроматографического пика в ЭК-ВГА / Mean chromatographic peak area in HITAEC	Кратность изменения / Fold change
TF	90962	26419	3,44
AHSG	695113	244501	2,84
SRGN	595779	214534	2,78
ECM1	67181	30192	2,23
APOA1	119512	60462	1,98
FN1	1574492	860800	1,83
ITIH4	32938	18327	1,80
APLP2	96040	55669	1,73
ITGA2	81698	49148	1,66
GRB2	73117	45633	1,60
HSPA5	475477	312478	1,52
RAC1	119381	80293	1,49
LAMP2	263660	179535	1,47
A2M	341661	233720	1,46
PTPN11	49449	34056	1,45
RHOA	71416	51105	1,40
CRK	177392	131707	1,35
PROCR	1150724	873383	1,32
PECAM1	282831	220934	1,28
CALU	339020	281961	1,20
MANF	178531	158181	1,13
TIMP1	379193	339589	1,12
AK3	59746	53116	1,12
PLAUR	32697	30555	1,07
QSOX1	320635	300391	1,07
PSAP	2258364	2160555	1,05
PDIA3	710565	684817	1,04
WDR1	856283	835433	1,02
APP	390647	383525	1,02
CYRIB	60514	60026	1,01
CD59	312550	330214	0,95
MYH9	738720	783483	0,94
FLNA	927651	1011144	0,92
VCL	291181	326552	0,89
TLN1	198168	222535	0,89
FAM3C	66051	75182	0,88
ACTN1	1420539	1617668	0,88
CD9	164357	187532	0,88
CLIC1	387017	445511	0,87
SERPINE1	1629711	1869701	0,87
TUBA4A	165801	194795	0,85
YWHAZ	1878904	2237022	0,84
PFN1	2601035	3133450	0,83
ACTG1	4089299	5053474	0,81
PEAR1	21654	26884	0,81
VWF	1475833	1838336	0,80
ACTN4	555656	696714	0,80
ACTB	2222910	2846595	0,78
OLA1	54730	70009	0,78
CALM1	1303528	1703002	0,77
TAGLN2	815662	1073421	0,76
CSRP1	297159	398861	0,75
SOD1	1059711	1408192	0,75
PPIA	3090916	4260119	0,73
GNB1	95645	133182	0,72
THBS1	4122806	5758811	0,72
ANXA5	75275	107967	0,70
SPARC	3005674	4361831	0,69
SERPINC1	29222	42724	0,68
CAP1	289739	437621	0,66
HSPB1	248875	406659	0,61
PLAU	7917	13111	0,60
CFL1	1510145	2600915	0,58
ALDOA	788987	1369576	0,58
MAPK1	72151	131699	0,55
TMSB4X	4298478	7935480	0,54
CD109	91518	175438	0,52
TFPI	53245	102339	0,52
GNB2	36428	71337	0,51
CD63	21282	42412	0,50
AP3B1	14057	31628	0,44
GNG12	36635	94758	0,39
PABPC4	13504	44400	0,30
GNAI2	13815	45627	0,30
MMRN1	269704	1150200	0,23
CLU	193233	1629994	0,12

тимерин-1) также обладал протромбогенным действием (табл. 15).

Далее был проведен анализ белков окислительного (табл. 16) и эндоплазматического (табл. 17) стресса в среде от контрольных и дисфункциональных ЭК. В среде от дисфункциональных ЭК наблюдалось повышенное содержание 2 белков окислительного стресса (табл. 16) и 5 белков эндоплазматического стресса (табл. 17), в среде от контрольных ЭК – 5 белков окислительного стресса (табл. 16) и 9 белков эндоплазматического стресса (табл. 17). На основании полученных результатов было сделано заключение, что окислительный и эндоплазматический стресс не характеризуется существенным выделением белков соответствующих сигнальных путей в среду.

Далее по общему массиву данных был проведен расширенный биоинформатический анализ молекулярных категорий среди 10% (в данном случае 125) белков с наибольшим содержанием в среде от дисфункциональных и контрольных ЭК. При помощи данного анализа в среде от контрольных ЭК было выявлено статистически значимо повышенное содержание компонентов сигнального пути Notch (играющего важную роль в регуляции эндотелиального гомеостаза), белков репарации ДНК и

пролиферативных белков, компонентов внеклеточного матрикса, а также провоспалительных и ангиогенных белков (табл. 18). Среда от ЭК-ВГА также отличалась статистически значимо повышенным содержанием белков сигнального пути Notch, сигнальных путей пролиферации, компонентов внеклеточного матрикса и провоспалительных белков (табл. 19).

На последнем этапе работы был проведен многопараметрический анализ провоспалительных цитокинов, выделяемых в среду ЭК-КА и ЭК-ВГА под воздействием первичных кальципротеиновых частиц (вызывающих умеренную дисфункцию эндотелия) и вторичных кальципротеиновых частиц (вызывающих выраженную дисфункцию эндотелия). Воздействие первичных кальципротеиновых частиц на ЭК-КА вызывало повышение выделения 12 провоспалительных цитокинов: интерлейкина (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, хемокинов GRO α /CXCL1, IP-10/CXCL10, MIP-1 α /CCL3, CCL11, фактора некроза опухоли- α (TNF- α), трансформирующего фактора роста- α (TGF- α), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора роста (G-CSF) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора роста (GM-CSF), в то время как при

Таблица 16. Ранжирование белков сигнальных путей окислительного стресса по кратности изменения их содержания (отражаемого средним значением площади хроматографического пика) в культуральной среде от контрольных и дисфункциональных ЭК при анализе данных высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией
Table 16. Levels of oxidative stress-related proteins (indicated by mean chromatographic peak area at high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) in the cell culture supernatant from control and dysfunctional ECs. Fold change ranking

Белок / Protein	Средняя площадь хроматографического пика в контрольных ЭК / Mean chromatographic peak area in the intact ECs	Средняя площадь хроматографического пика в дисфункциональных ЭК / Mean chromatographic peak area in dysfunctional ECs	Кратность изменения / Fold change
PPIA	3792438	6676717	1,76
STAU1	28979	48068	1,66
PARK7	625713	884444	1,41
PRDX5	180666	253302	1,40
SOD2	105328	146625	1,39
NAGLU	82370	98485	1,20
GSR	156997	174480	1,11
PRDX3	182882	202255	1,11
PRDX2	123413	117009	0,95
SNCA	78351	65379	0,83
HSPA1A	164986	111947	0,68
PARP1	112949	74504	0,66
G6PD	136933	83678	0,61
NQO1	172289	87904	0,51
EIF2S1	117159	38870	0,33
STK24	53536	12504	0,23

Таблица 17. Ранжирование белков сигнальных путей эндоплазматического стресса по кратности изменения их содержания (отражаемого средним значением площади хроматографического пика) в культуральной среде от контрольных и дисфункциональных ЭК при анализе данных высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией
Table 17. Levels of endoplasmic reticulum stress-related proteins (indicated by mean chromatographic peak area at high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) in the cell culture supernatant from control and dysfunctional ECs. Fold change ranking

Белок / Protein	Средняя площадь хроматографического пика в контрольных ЭК / Mean chromatographic peak area in the intact ECs	Средняя площадь хроматографического пика в дисфункциональных ЭК / Mean chromatographic peak area in dysfunctional ECs	Кратность изменения / Fold change
UFM1	64163	251908	3,93
UFC1	41175	107023	2,60
GORASP2	98915	232703	2,35
MARCKS	248982	547701	2,20
NCK1	34958	61645	1,76
CXCL8	84781	119695	1,41
BCAP31	114966	111202	0,97
WFS1	67980	49407	0,73
PDIA3	695116	377186	0,54
HSPA5	377677	178888	0,47
P4HB	478240	223252	0,47
HSP90B1	238672	100349	0,42
PDIA6	159871	60877	0,38
PDIA4	216920	76672	0,35
EIF2S1	117159	38870	0,33
TARDBP	131123	34638	0,26
THBS1	5104409	888317	0,17

добавлении первичных кальципротеиновых частиц к ЭК-ВГА наблюдалось повышенное выделение 5 провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-8, IP-10/CXCL10 и RANTES/CCL5, табл. 20). Воздействие вторичных кальципротеиновых частиц на ЭК-КА приводило к повышению выделения 30 провоспалительных цитокинов: интерлейкина (IL)-1 α , IL- β , IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17 α , растворимой формы рецептора к IL-1 α (IL-1R α), хемокинов GRO α /CXCL1, IP-10/CXCL10, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4, RANTES/CCL5, MCP-3/CCL7, эотаксина/CCL11, MDC/CCL22, TNF- α , лимфотоксина-альфа (LT- α)/фактора некроза опухоли- α (TNF- β), TGF- α , G-CSF, GM-CSF, альфа-2-интерферона (IFN- α 2), гамма-интерферона (IFN- γ), растворимого CD40-лиганда (sCD40L) и лиганда fms-подобной тирозинкиназы 3 (Flt-3L, табл. 20). В то же время воздействие вторичных кальципротеиновых частиц на ЭК-ВГА вызывало повышение секреции лишь 10 провоспалительных цитокинов: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-13, IL-17 α , IP-10/CXCL10, RANTES/CCL5, GM-CSF, TNF- β и IFN- α 2 (табл. 20). Таким образом, в сравнении с ЭК-КА ЭК-ВГА обладали существенно большей устойчивостью к провоспалительной активации при 24-часовой инкубации с модельным пусковым фактором дисфункции эндотелия. Базальная концентрация большинства (22) провоспалительных цитокинов между ЭК-ВГА и ЭК-КА значимо не отличалась (кратность изменения менее чем в 1,25 раза), при этом 7 цитокинов (IL-1 β , IL-8, IL-12, IP-10/CXCL10, RANTES/CCL5, эотаксин/CCL11, GM-CSF) характеризовались повышенным содержанием в среде от ЭК-ВГА, а 1 (IL-6) – в среде от ЭК-КА (табл. 20).

Обсуждение

Сравнительный анализ молекул, выделяемых контрольными и дисфункциональными ЭК, имеет принципиальное значение для последующего анализа функциональной гетерогенности ЭК различных направлений дифференцировки, а также ЭК атерочувствительных и атерорезистентных артерий. В данном исследовании совокупность молекул, выделяемых ЭК-КА и ЭК-ВГА в культуральную среду, была подразделена на классы белков, функционально значимые для физиологии эндотелия. К таким категориям были отнесены маркеры эндотелиального фенотипа, компоненты эндотелиальной базальной мембраны и субэндотелиального внеклеточного матрикса, белки сигнальных путей ангиогенеза, белки сигнальных путей активации и агрегации тромбоцитов и свертывания крови, а также белки ответа на окислительный и эндоплазматический стресс. В данном контексте наличие растворимых форм рецепторных маркеров и компонентов эндотелиального гликокаликса в среде

отражает непосредственное снижение жизнеспособности ЭК, синтез компонентов базальной мембраны и внеклеточного матрикса – активность синтетических процессов, белки сигнальных путей ангиогенеза косвенно указывают на способность ЭК к формированию капилляров (об этом, в частности, может свидетельствовать соотношение про- и анти-ангиогенных белков), а белки сигнальных путей активации и агрегации тромбоцитов и свертывания крови могут сигнализировать о развитии протромботической дисфункции эндотелия (при этом необходимо учитывать соотношение белков с протромбогенным и антипротромбогенным действием).

В предыдущем исследовании нами было выделено 45 основных маркеров эндотелиального фенотипа, экспрессируемых в ЭК на генном и белковом уровне, однако роль большинства из них в развитии дисфункции эндотелия в клинических исследованиях не изучалась. В данной работе нами было выделено 28 маркеров эндотелиального фенотипа, выделяемых ЭК в культуральную среду, и определены 12 из них, характеризующиеся повышенным содержанием в среде от дисфункциональных ЭК (при этом концентрация растворимых форм интегринов ITGB1, ITGA2 и ITGA5 была повышена как в среде от дисфункциональных ЭК, так и в среде от ЭК-КА). В дальнейших исследованиях целесообразно провести анализ чувствительности и специфичности растворимых форм данных белков как молекулярных маркеров дисфункции различных линий ЭК при воздействии различных пусковых факторов (цитотоксические препараты, кальципротеиновые частицы, мочевины, провоспалительные цитокины, липополисахарид, насыщенные жирные кислоты, дефицит питательных веществ, S1-субъединица Spike-белка или рецептор-связывающий домен коронавируса SARS-CoV-2, ингибиторы эндотелиальной NO-синтазы). В число указанных 12 маркеров входили классические рецепторы ЭК (EPHB2, KDR, TEK, ENG, BSG, MCAM), связывающие ЭК с базальной мембраной интегрины (ITGA5, ITGA2, ITGB1) и белки межклеточных контактов (PTPRB и F11R/JAM-A); кроме того, большинство данных белков обладало про-ангиогенным действием (рецептор к эфрину EPHB2, рецептор к фактору роста сосудистого эндотелия KDR, рецептор к ангиопоэтину-1 TEK, рецептор к TGF- β эндоглин, модулирующая активность KDR и TEK эндотелиальная фосфатаза PTPRB). Верификационный анализ содержания растворимых форм данных белков в среде от ЭК при воздействии различных пусковых факторов дисфункции эндотелия в сравнении с классическими определяемыми в литературе маркерами (PECAM1, VE-кадгерин, VCAM-1 и ICAM-1) может позволить выделить один или несколько молекулярных маркеров дисфункции эндотелия, пригодных для дальнейшего клинического тести-

рования. Повышенное содержание растворимых форм интегринов (ITGA5, ITGA2, ITGB1) в среде от ЭК-КА в сравнении с ЭК-ВГА при ее протеомном профилировании представляет собой особый интерес и требует расширенного анализа с сочетанием дот-блоттинга и иммуноферментного анализа.

Ранее было показано, что растворимые формы эндотелиальных рецепторов (в частности, растворимые формы VCAM-1 и E-селектина) [24], а также содержащийся в цитозоле ЭК фактор фон Виллебранда [25] могут иметь высокую чувствительность и специфичность в качестве маркеров дисфункции эндотелия у пациентов с COVID-19. Увеличение концентрации растворимой формы VE-кадгерина было отмечено у пациентов с полиорганной недостаточностью [33]. В отношении хронических патологий было продемонстрировано, что повышенная концентрация растворимых форм ICAM-1, E-селектина и фактора фон Виллебранда в сыворотке крови ассоциированы с развитием ишемического инсульта [26, 27] и сахарного диабета [28, 29]. Кроме того, была выявлена связь увеличенной концентрации VCAM-1 и ICAM-1 в сыворотке крови с повышенным содержанием взвешенных частиц в атмосферном воздухе [30], при клинической депрессии [31] и при системной склеродермии [32], являющихся факторами сердечно-сосудистого риска. В совокупности данные исследования позволяют предположить клиническую релевантность растворимых форм эндотелиальных рецепторов в качестве вероятных маркеров дисфункции эндотелия. Вполне возможно, что скрининговый (многопараметрический) анализ циркулирующих маркеров эндотелиального фенотипа у различных категорий пациентов может позволить определить наиболее высокочувствительные и высокоспецифичные из них с целью последующего подтверждения их диагностической ценности методом иммуноферментного анализа.

Достаточно интересным является снижение выделения дисфункциональными ЭК компонентами базальной мембраны и субэндотелиального внеклеточного матрикса. В этом отношении необходимо отметить снижение секреции целого ряда таких белков (перлекана, коллагена IV типа, нидогена-1, бета-2-субъединицы ламинина LAMB2, мультимерина-2 и аннексина A2) ЭК-КА в сравнении с ЭК-ВГА, что также может свидетельствовать об их патологическом фенотипе. Феномен уменьшения выделения компонентов эндотелиальной базальной мембраны при отсутствии патологических изменений секреции белков субэндотелиального внеклеточного матрикса в ЭК-КА может свидетельствовать о снижении регенеративного потенциала ЭК и требует дальнейшего изучения в контексте исследования молекулярных маркеров дисфункции эндотелия. В этом отношении пер-

спективным подходом к сравнительной оценке патофизиологической ценности двух данных групп молекул является дот-блоттинг, при котором возможна полуколичественная оценка всех активно выделяемых и вместе с тем гипоекспрессированных в среде от дисфункциональных ЭК маркеров эндотелиальной базальной мембраны (остеонектина, перлекана, фибронектина, ламинина, гомолога лизилоксидазы 2, фибулина-1, агрина, нидогена-1, коллагена IV типа, пероксидазина и коллагена VI типа) и белков субэндотелиального внеклеточного матрикса (тромбоспондина-1, фактора роста соединительной ткани, EGF-содержащего фибулиноподобного белка, тканевых ингибиторов металлопротеиназ-1 и -2, транслутаминазы 2, матриксной металлопротеиназы-2, тистикана-1, ассоциированного с микрофибриллами белка MFAP2, бигликана и богатого цистеином индуктора ангиогенеза CCN1). Гипотеза о более высокой диагностической ценности компонентов эндотелиальной базальной мембраны в сравнении с белками субэндотелиального внеклеточного матрикса выглядит особенно привлекательной в контексте их вероятной более высокой специфичности для ЭК, однако также нуждается в дальнейшей валидации на клеточных культурах и в клинических исследованиях (по аналогии с растворимыми формами эндотелиальных рецепторов). В отношении этого класса молекул предложенный выше скрининговый подход представляется несколько более простым в реализации в силу большого количества рецепторных маркеров эндотелиального фенотипа (45) с учетом дополнительной необходимости профилирования маркеров эндотелиального гликокаликса (синдекан-1, синдекан-2, синдекан-4, эндокан, гиалуроновая кислота, тромбомодулин). Кроме того, выделяемые ЭК компоненты базальной мембраны теоретически должны характеризоваться низкой активностью синтеза или полным отсутствием экспрессии в циркулирующих в крови иммунных клетках, эритроцитах и тромбоцитах (что не всегда справедливо для рецепторных маркеров эндотелиального фенотипа в силу их не всегда высокой специфичности и тем более для провоспалительных цитокинов, широкий спектр которых в большом количестве секретруется иммунными клетками). В целом снижение жизнеспособности эндотелия (сопровождающееся выделением его рецепторных маркеров в микроокружение и системный кровоток) логично сочетается с нарушением его регенеративных способностей (отражаемых сниженной активностью синтеза компонентов базальной мембраны).

Третьим существенным отличием секреторного профиля ЭК-КА от ЭК-ВГА было повышенное количество белков сигнальных путей активации и агрегации тромбоцитов в среде от ЭК-КА. Вместе с тем среди дифференциально экспрессируемых в

Таблица 18. Молекулярные категории биоинформатических баз данных (Gene Ontology и Reactome) среди 125 (10%) белков с наиболее повышенным содержанием в культуральной среде от контрольных ЭК в сравнении с дисфункциональными ЭК при анализе данных высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией. Ранжирование по мануально выделенным классам молекул и по кратности изменения экспрессии (fold change)

Table 18. Molecular terms (Gene Ontology and Reactome) among top 125 (10%) proteins overexpressed in the intact ECs as compared with dysfunctional ECs. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The molecular classes (right column) have been selected manually. Molecular class ranking followed by a fold change ranking

База данных / Database	Молекулярная категория / Molecular term	Номер молекулярной категории в базе данных / ID number	Количество белков в молекулярной категории из 125 наиболее экспрессированных белков / Number of molecular term proteins in 125 most expressed proteins	Процент белков молекулярной категории из 125 наиболее экспрессированных белков / Proportion of molecular term proteins from 125 most expressed proteins	Кратность изменения экспрессии / Fold change	Значение FDR / FDR	Класс молекул / Molecular class
Reactome	Транскрипция и трансляция компонентов сигнального пути NOTCH / Pre-NOTCH Transcription and translation	R-HSA-1912408	24	15,79	21,94	$1,94 \times 10^{-23}$	Сигнальный путь NOTCH / Signaling by NOTCH
Reactome	Сигнальный путь NOTCH / Signaling by NOTCH	R-HSA-157118	25	16,45	9,75	$3,38 \times 10^{-16}$	Сигнальный путь NOTCH / Signaling by NOTCH
Gene Ontology Biological Process	Организация теломер / Telomere organization	GO:0032200	24	15,79	115,43	$6,68 \times 10^{-43}$	Репарация ДНК / DNA repair
Reactome	Негомологичное соединение концов / Nonhomologous end-joining	R-HSA-5693571	14	9,21	18,10	$3,21 \times 10^{-12}$	Репарация ДНК / DNA repair
Reactome	Экцизионная репарация оснований / Base excision repair	R-HSA-73884	14	9,21	13,62	$1,25 \times 10^{-10}$	Репарация ДНК / DNA repair
Reactome	Поддержание функции теломер / Telomere maintenance	R-HSA-157579	14	9,21	11,11	$1,65 \times 10^{-9}$	Репарация ДНК / DNA repair
Reactome	Поддержание функции хромосом / Chromosome maintenance	R-HSA-73886	14	9,21	8,92	$2,42 \times 10^{-8}$	Репарация ДНК / DNA repair
Reactome	Гомологичная рекомбинация / Homology directed repair	R-HSA-5693538	14	9,21	8,92	$2,42 \times 10^{-8}$	Репарация ДНК / DNA repair
Reactome	Хроматин-модифицирующие ферменты / Chromatin modifying enzymes	R-HSA-3247509	24	15,79	7,90	$1,66 \times 10^{-13}$	Репарация ДНК / DNA repair
Reactome	Репарация двуцепочечных разрывов ДНК / DNA double-strand break repair	R-HSA-5693532	14	9,21	7,32	$2,54 \times 10^{-7}$	Репарация ДНК / DNA repair
Reactome	Репарация ДНК / DNA repair	R-HSA-73894	14	9,21	3,75	$3,36 \times 10^{-4}$	Репарация ДНК / DNA repair
Gene Ontology Molecular Function	Структурные компоненты хроматина / Structural constituent of chromatin	GO:0030527	24	15,79	28,41	$1,86 \times 10^{-24}$	Пролиферация / Proliferation
Reactome	Сборка предрепликативного комплекса / Assembly of the pre-replicative complex	R-HSA-68867	24	15,79	16,21	$1,88 \times 10^{-20}$	Пролиферация / Proliferation
Reactome	Инициация репликации ДНК / DNA Replication pre-initiation	R-HSA-69002	24	15,79	14,38	$2,64 \times 10^{-19}$	Пролиферация / Proliferation
Gene Ontology Biological Process	Организация хроматина / Chromatin organization	GO:0006325	27	17,76	13,80	$1,07 \times 10^{-19}$	Пролиферация / Proliferation
Reactome	Репликация ДНК / DNA replication	R-HSA-69306	26	17,11	12,65	$1,27 \times 10^{-19}$	Пролиферация / Proliferation
Reactome	Контрольные точки клеточного цикла / Cell cycle checkpoints	R-HSA-69620	15	9,87	4,88	$9,36 \times 10^{-6}$	Пролиферация / Proliferation
Gene Ontology Molecular Function	Связывание ламинина / Laminin binding	GO:0043236	5	3,29	26,39	$8,60 \times 10^{-4}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Gene Ontology Molecular Function	Структурные компоненты внеклеточного матрикса / extracellular matrix structural constituent	GO:0005201	18	11,84	18,84	$7,95 \times 10^{-15}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Gene Ontology Cellular Component	Базальная мембрана / Basement membrane	GO:0005604	10	6,58	14,10	$6,82 \times 10^{-7}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Gene Ontology Molecular Function	Связывание коллагена / Collagen binding	GO:0005518	7	4,61	12,67	$5,36 \times 10^{-4}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Reactome	Формирование эластических волокон / Elastic fibre formation	R-HSA-1566948	6	3,95	12,34	$4,44 \times 10^{-4}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix

Gene Ontology Biological Process	Организация коллагеновых фибрилл / Collagen fibril organization	GO:0030199	6	3,95	11,80	$9,70 \times 10^{-3}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Gene Ontology Cellular Component	Коллагенсодержащий внеклеточный матрикс / Collagen-containing extracellular matrix	GO:0062023	30	19,74	10,61	$1,10 \times 10^{-19}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Reactome	Протеогликаны внеклеточного матрикса / ECM proteoglycans	R-HSA-3000178	8	5,26	9,53	$7,89 \times 10^{-5}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Reactome	Репликация ДНК / DNA replication	R-HSA-69306	26	17,11	12,65	$1,27 \times 10^{-19}$	Пролиферация / Proliferation
Reactome	Контрольные точки клеточного цикла / Cell cycle checkpoints	R-HSA-69620	15	9,87	4,88	$9,36 \times 10^{-6}$	Пролиферация / Proliferation
Gene Ontology Molecular Function	Связывание ламинина / Laminin binding	GO:0043236	5	3,29	26,39	$8,60 \times 10^{-4}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Gene Ontology Molecular Function	Структурные компоненты внеклеточного матрикса / Extracellular matrix structural constituent	GO:0005201	18	11,84	18,84	$7,95 \times 10^{-15}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Gene Ontology Cellular Component	Базальная мембрана / Basement membrane	GO:0005604	10	6,58	14,10	$6,82 \times 10^{-7}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Gene Ontology Molecular Function	Связывание коллагена / Collagen binding	GO:0005518	7	4,61	12,67	$5,36 \times 10^{-4}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Reactome	Формирование эластических волокон / Elastic fibre formation	R-HSA-1566948	6	3,95	12,34	$4,44 \times 10^{-4}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Gene Ontology Biological Process	Организация коллагеновых фибрилл / Collagen fibril organization	GO:0030199	6	3,95	11,80	$9,70 \times 10^{-3}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Gene Ontology Cellular Component	Коллагенсодержащий внеклеточный матрикс / Collagen-containing extracellular matrix	GO:0062023	30	19,74	10,61	$1,10 \times 10^{-19}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Reactome	Протеогликаны внеклеточного матрикса / ECM proteoglycans	R-HSA-3000178	8	5,26	9,53	$7,89 \times 10^{-5}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Gene Ontology Cellular Component	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix	GO:0031012	15	9,87	9,20	$2,31 \times 10^{-8}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Reactome	Формирование коллагена / Collagen formation	R-HSA-1474290	7	4,61	7,04	$1,69 \times 10^{-3}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Reactome	Организация внеклеточного матрикса / Extracellular matrix organization	R-HSA-1474244	25	16,45	7,00	$5,24 \times 10^{-13}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Reactome	Биосинтез и модификация коллагена / Collagen biosynthesis and modifying enzymes	R-HSA-1650814	5	3,29	6,75	$1,86 \times 10^{-2}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Reactome	Деградация внеклеточного матрикса / Degradation of the extracellular matrix	R-HSA-1474228	8	5,26	5,13	$3,18 \times 10^{-3}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Reactome	Секреторный фенотип, ассоциированный со старением / Senescence-associated secretory phenotype	R-HSA-2559582	24	15,79	19,22	$3,92 \times 10^{-22}$	Воспаление / Inflammation
Reactome	Старение, вызванное окислительным стрессом / Oxidative stress induced senescence	R-HSA-2559580	24	15,79	17,24	$4,38 \times 10^{-21}$	Воспаление / Inflammation
Reactome	Старение, индуцированное повреждениями ДНК или критическим укорачиванием теломер / DNA damage/telomere stress induced senescence	R-HSA-2559586	14	9,21	15,64	$2,04 \times 10^{-11}$	Воспаление / Inflammation
Reactome	Клеточное старение / Cellular senescence	R-HSA-2559583	24	15,79	10,97	$1,26 \times 10^{-16}$	Воспаление / Inflammation
Reactome	Сигнальные пути интерлейкинов / Signaling by interleukins	R-HSA-449147	19	12,50	3,65	$1,57 \times 10^{-5}$	Воспаление / Inflammation
Reactome	Сигнальные пути цитокинов / Cytokine signaling in immune system	R-HSA-1280215	25	16,45	2,82	$2,31 \times 10^{-5}$	Воспаление / Inflammation
Gene Ontology Biological Process	Стимуляция миграции ЭК / Positive regulation of EC migration	GO:0010595	6	3,95	11,63	$9,84 \times 10^{-3}$	Ангиогенез / Angiogenesis
Reactome	Сигнальный путь VEGF / Signaling by VEGF	R-HSA-194138	8	5,26	6,70	$6,97 \times 10^{-4}$	Ангиогенез / Angiogenesis
Reactome	Сигнальный путь VEGFA-VEGFR2 / VEGFA-VEGFR2 pathway	R-HSA-4420097	6	3,95	5,60	$1,31 \times 10^{-2}$	Ангиогенез / Angiogenesis
Gene Ontology Biological Process	Стимуляция биосинтеза NO / Positive regulation of nitric oxide biosynthetic process	GO:0045429	6	3,95	16,58	$2,62 \times 10^{-3}$	Монооксид азота (NO) / Nitric oxide

Таблица 19. Молекулярные категории биоинформатических баз данных (Gene Ontology и Reactome) среди 125 (10%) белков с наиболее повышенным содержанием в культуральной среде от ЭК-ВГА в сравнении с ЭК-КА при анализе данных высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. Ранжирование по мануально выделенным классам молекул и по кратности изменения экспрессии (fold change)

Table 19. Molecular terms (Gene Ontology and Reactome) among top 125 (10%) proteins overexpressed in human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) as compared with human coronary artery endothelial cells (HCAEC). High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The molecular classes (right column) have been selected manually. Molecular class ranking followed by a fold change ranking

База данных / Database	Молекулярная категория / Molecular term	Номер молекулярной категории в базе данных / ID number	Количество белков в молекулярной категории из 125 наиболее экспрессированных белков / Number of molecular term proteins in 125 most expressed proteins	Процент белков молекулярной категории из 125 наиболее экспрессированных белков / Proportion of molecular term proteins from 125 most expressed proteins	Кратность изменения экспрессии / Fold change	Значение FDR / FDR	Класс молекул / Molecular class
Reactome	Транскрипция и трансляция компонентов сигнального пути Notch / Pre-NOTCH transcription and translation	R-HSA-1912408	10	7,25	10,27	$7,85 \times 10^{-6}$	Сигнальный путь NOTCH / Signaling by NOTCH
Reactome	Процессинг и экспрессия компонентов сигнального пути Notch / Pre-NOTCH expression and processing	R-HSA-1912422	10	7,25	8,84	$1,93 \times 10^{-5}$	Сигнальный путь NOTCH / Signaling by NOTCH
Reactome	Сигнальный путь NOTCH / Signaling by NOTCH	R-HSA-157118	10	7,25	4,38	$2,93 \times 10^{-3}$	Сигнальный путь NOTCH / Signaling by NOTCH
Gene Ontology Biological Process	Организация теломер / Telomere organization	GO:0032200	10	7,25	53,44	$1,02 \times 10^{-10}$	Пролиферация / Proliferation
Gene Ontology Molecular Function	Структурные компоненты хроматина / Structural constituent of chromatin	GO:0030527	11	7,97	14,45	$6,90 \times 10^{-7}$	Пролиферация / Proliferation
Reactome	Сборка предрепликативного комплекса / Assembly of the pre-replicative complex	R-HSA-68867	10	7,25	7,59	$5,57 \times 10^{-5}$	Пролиферация / Proliferation
Reactome	Инициация репликации ДНК / DNA Replication pre-initiation	R-HSA-69002	10	7,25	6,74	$1,31 \times 10^{-4}$	Пролиферация / Proliferation
Reactome	Репликация ДНК / DNA replication	R-HSA-69306	11	7,97	6,02	$1,11 \times 10^{-4}$	Пролиферация / Proliferation
Gene Ontology Biological Process	Организация хроматина / Chromatin organization	GO:0006325	10	7,25	5,68	$1,23 \times 10^{-2}$	Пролиферация / Proliferation
Reactome	Хроматин-модифицирующие ферменты / Chromatin modifying enzymes	R-HSA-3247509	10	7,25	3,70	$8,16 \times 10^{-3}$	Пролиферация / Proliferation
Gene Ontology Molecular Function	Структурные компоненты внеклеточного матрикса / Extracellular matrix structural constituent	GO:0005201	8	5,80	9,29	$1,54 \times 10^{-3}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Gene Ontology Cellular Component	Коллагенсодержащий внеклеточный матрикс / Collagen-containing extracellular matrix	GO:0062023	15	10,87	5,97	$1,21 \times 10^{-5}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Reactome	Организация внеклеточного матрикса / Extracellular matrix organization	R-HSA-1474244	11	7,97	3,46	$7,15 \times 10^{-3}$	Внеклеточный матрикс / Extracellular matrix
Reactome	Секреторный фенотип, ассоциированный со старением / Senescence-associated secretory phenotype	R-HSA-2559582	12	8,70	10,80	$1,03 \times 10^{-6}$	Воспаление / Inflammation
Reactome	Старение, вызванное окислительным стрессом / Oxidative stress induced senescence	R-HSA-2559580	11	7,97	8,88	$6,79 \times 10^{-6}$	Воспаление / Inflammation
Reactome	Клеточное старение / Cellular senescence	R-HSA-2559583	12	8,70	6,16	$3,35 \times 10^{-5}$	Воспаление / Inflammation
Reactome	Сигнальные пути интерлейкинов / Signaling by interleukins	R-HSA-449147	21	15,22	4,54	$1,07 \times 10^{-6}$	Воспаление / Inflammation
Reactome	Сигнальные пути цитокинов / Cytokine Signaling in immune system	R-HSA-1280215	25	18,12	3,17	$9,04 \times 10^{-6}$	Воспаление / Inflammation
Reactome	Иммунная система / Immune system	R-HSA-168256	38	27,54	1,78	$1,90 \times 10^{-3}$	Воспаление / Inflammation

Таблица 20. Анализ провоспалительных цитокинов в культуральной среде от ЭК-КА методом xMAP (при помощи конъюгированных с антителами флуоресцентно меченных магнитных микросфер) после 24-часового воздействия первичных (КПЧ-С) и вторичных (КПЧ-И) кальципротеиновых частиц

Table 20. Multi-analyte profiling (xMAP) measurement of pro-inflammatory cytokines in the cell culture supernatant from HCAEC treated with primary (CPP-P) or secondary (CPP-S) calciprotein particles for 24 hours

Концентрация цитокинов, пг/мл / Cytokine level, pg/mL	IL-1a		IL-1b		IL-2		IL-5		IL-6	
Линия ЭК / EC line	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC
ФСБД / DPBS	9,01	8,88	2,99	4,70	1,92	1,90	1,06	0,93	7,41	4,79
КПЧ-С / CPP-P	8,71	7,96	11,77	8,87	1,73	1,36	0,63	0,76	112,98	21,84
КПЧ-И / CPP-S	18,13	9,10	15,39	10,88	3,04	1,21	1,42	1,13	243,51	59,74
Кратность изменения (КПЧ-С) / Fold change (CPP-P)	0,97	0,90	3,94	1,89	0,90	0,72	0,60	0,81	15,24	4,56
Кратность изменения (КПЧ-И) / Fold change (CPP-S)	2,01	1,03	5,16	2,31	1,58	0,64	1,35	1,22	32,84	12,48
Кратность изменения в ЭК-ВГА в сравнении с ЭК-КА / Fold change in HITAEC vs. HCAEC	0,98		1,58		0,99		0,88		0,65	
Концентрация цитокинов, пг/мл / Cytokine level, pg/mL	IL-7		IL-8		IL-10		IL-12		IL-13	
Линия ЭК / EC line	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC
ФСБД / DPBS	3,33	3,30	435,02	1 477,37	4,65	5,16	11,87	25,67	3,98	3,94
КПЧ-С / CPP-P	3,55	3,49	2 000,00	2 000,00	4,38	4,13	27,62	13,99	3,79	3,82
КПЧ-И / CPP-S	6,53	3,54	2 000,00	2 000,00	10,43	5,02	35,27	17,61	7,70	5,93
Кратность изменения (КПЧ-С) / Fold change (CPP-P)	1,07	1,06	4,60	1,35	0,94	0,80	2,33	0,54	0,95	0,97
Кратность изменения (КПЧ-И) / Fold change (CPP-S)	1,96	1,07	4,60	1,35	2,24	0,97	2,97	0,69	1,93	1,50
Кратность изменения в ЭК-ВГА в сравнении с ЭК-КА / Fold change in HITAEC vs. HCAEC	0,99		3,40		1,11		2,16		0,99	
Концентрация цитокинов, пг/мл / Cytokine level, pg/mL	IL-15		IL-17a		IL-1Ra		CXCL1		CXCL10	
Линия ЭК / EC line	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC
ФСБД / DPBS	2,89	2,77	3,50	3,66	14,06	16,09	685,4	655,5	29,35	57,88
КПЧ-С / CPP-P	2,24	2,49	3,14	4,23	13,58	13,99	1580,8	628,4	83,41	91,46
КПЧ-И / CPP-S	3,65	2,90	8,48	6,29	35,80	14,58	1635,9	655,4	107,23	87,65
Кратность изменения (КПЧ-С) / Fold change (CPP-P)	0,77	0,90	0,90	1,16	0,97	0,87	2,31	0,96	2,84	1,58
Кратность изменения (КПЧ-И) / Fold change (CPP-S)	1,26	1,05	2,42	1,72	2,55	0,91	2,39	1,00	3,65	1,51
Кратность изменения в ЭК-ВГА в сравнении с ЭК-КА / Fold change in HITAEC vs. HCAEC	0,96		1,05		1,14		0,96		1,97	
Концентрация цитокинов, пг/мл / Cytokine level, pg/mL	CCL3		CCL4		CCL5		CCL7		CCL11	
Линия ЭК / EC line	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC
ФСБД / DPBS	11,30	12,08	2,99	2,69	19,34	32,97	27,91	28,60	15,75	22,85
КПЧ-С / CPP-P	16,63	9,97	2,46	2,21	21,21	59,73	24,83	25,93	21,96	22,73
КПЧ-И / CPP-S	24,03	13,18	5,33	1,96	43,91	105,72	41,49	29,97	26,61	20,70
Кратность изменения (КПЧ-С) / Fold change (CPP-P)	1,47	0,83	0,82	0,82	1,10	1,81	0,89	0,91	1,39	0,99
Кратность изменения (КПЧ-И) / Fold change (CPP-S)	2,13	1,09	1,78	0,73	2,27	3,21	1,49	1,05	1,69	0,91
Кратность изменения в ЭК-ВГА в сравнении с ЭК-КА / Fold change in HITAEC vs. HCAEC	1,07		0,90		1,71		1,02		1,45	
Концентрация цитокинов, пг/мл / Cytokine level, pg/mL	CCL22		TNF-a		TNF-b		TGF-a		G-CSF	
Линия ЭК / EC line	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC
ФСБД / DPBS	39,19	34,53	2,44	2,63	8,10	6,87	1,07	1,17	1,02	1,15
КПЧ-С / CPP-P	27,09	23,74	5,06	2,58	6,47	7,52	2,14	0,78	2,15	1,19
КПЧ-И / CPP-S	90,57	33,50	4,85	2,63	13,24	8,42	2,99	0,90	6,13	1,20
Кратность изменения (КПЧ-С) / Fold change (CPP-P)	0,69	0,69	2,08	0,98	0,80	1,09	2,01	0,66	2,11	1,03
Кратность изменения (КПЧ-И) / Fold change (CPP-S)	2,31	0,97	1,99	1,00	1,64	1,22	2,80	0,77	6,01	1,04
Кратность изменения в ЭК-ВГА в сравнении с ЭК-КА / Fold change in HITAEC vs. HCAEC	0,88		1,08		0,85		1,10		1,13	
Концентрация цитокинов, пг/мл / Cytokine level, pg/mL	GM-CSF		IFNa2		IFNy		sCD40L		Flt-3L	
Линия ЭК / EC line	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC	ЭК-КА / HCAEC	ЭК-ВГА / HITAEC
ФСБД / DPBS	9,55	15,26	18,43	21,30	9,29	9,56	19,46	20,36	16,71	15,42
КПЧ-С / CPP-P	16,24	14,53	15,89	15,77	9,26	7,96	16,55	11,96	16,63	14,11
КПЧ-И / CPP-S	26,13	20,38	33,70	27,90	16,90	9,95	32,05	17,57	26,02	16,08
Кратность изменения (КПЧ-С) / Fold change (CPP-P)	1,70	0,95	0,86	0,74	1,00	0,83	0,85	0,59	0,99	0,91
Кратность изменения (КПЧ-И) / Fold change (CPP-S)	2,74	1,34	1,83	1,31	1,82	1,04	1,65	0,86	1,56	1,04
Кратность изменения в ЭК-ВГА в сравнении с ЭК-КА / Fold change in HITAEC vs. HCAEC	1,60		1,16		1,03		1,05		0,92	

Примечание: ФСБД – фосфатно-солевого буфера по Дульбекко; ЭК – эндотелиальные клетки; ЭК-ВГА – эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии; ЭК-КА – эндотелиальные клетки коронарной артерии.

Note: CPP-P – primary calciprotein particles; CPP-S – secondary calciprotein particles; DPBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; EC – endothelial cells; HCAEC – human coronary artery endothelial cells; HITAEC – human internal thoracic artery endothelial cells.

среде от ЭК-КА белков не было выявлено явного преобладания про-тромбогенных молекул над анти-тромбогенными, что с учетом отсутствия признаков протромботической активации эндотелия в предыдущих исследованиях по моделированию его дисфункции [5, 34-36] позволяет предположить меньшую патофизиологическую значимость данной находки в сравнении с вышеуказанными (повышением содержания рецепторных маркеров и снижением выделения компонентов базальной мембраны). Следует отметить, что количество белков сигнальных путей активации и агрегации тромбоцитов или сигнальных путей ангиогенеза в среде от дисфункциональных и контрольных ЭК было приблизительно равным, что также позволяет предположить отсутствие (или слабую выраженность) нарушений данных звеньев гомеостаза эндотелия при развитии его дисфункции (поскольку для их диагностики принципиальна оценка содержания именно секретируемых, а не просто синтезируемых в ЭК белков). Аналогичные наблюдения были сделаны и в отношении содержания белков сигнальных путей окислительного и эндоплазматического стресса в среде от дисфункциональных и контрольных ЭК, однако в данном случае, напротив, более информативным является анализ их содержания внутри клетки (где они оказывают основной патологический эффект), а не в культуральной среде.

Расширенный биоинформатический анализ дифференциально экспрессированных молекулярных категорий позволил подтвердить гомеостатический профиль молекул, выделяемых ЭК-ВГА. Качественный состав молекул, выделяемых контрольными ЭК и ЭК-ВГА, характеризовался повышенной представленностью компонентов сигнального пути Notch, сигнальных путей пролиферации, компонентов внеклеточного матрикса и провоспалительных белков. При этом следует отметить необходимость провоспалительных белков (к примеру, выделяемых моноцитами 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) для ускорения пролиферации ЭК [37, 38]. Примером этого является культивирование колониеформирующих эндотелиальных клеток, деление которых в первые дни после выделения из периферической крови в значительной степени зависит от моноцитов и лимфоцитов, выделяемых в градиент фиколла вместе с клетками-предшественниками и секретирующих в микроокружение большое количество провоспалительных цитокинов [37, 38]. При этом 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), что позволяет предположить высокий уровень адаптации

ЭК (в частности, ЭК-ВГА) к базальному уровню секреции данных молекул на ЭК. В противном случае пролиферативная активность немногочисленных колоний эндотелиальных клеток-предшественников (объективно неспособных к выделению сколько-нибудь существенного количества цитокинов) подавлялась бы большим количеством провоспалительных цитокинов, выделяемых моноцитами и лимфоцитами.

Возможно, именно адаптация ЭК-ВГА к базальной секреции провоспалительных цитокинов способствует их повышенной устойчивости к воздействию модельных пусковых факторов дисфункции эндотелия. При многопараметрическом профилировании цитокинов в культуральной среде ЭК-ВГА отличались повышенной базальной экспрессией большого количества провоспалительных цитокинов (IL-1b, IL-8, IL-12, IP-10/CXCL10, RANTES/CCL5, эотаксин/CCL11, GM-CSF) в сравнении с ЭК-КА, в среде от которых более чем в 1,25 раза была повышена экспрессия лишь IL-6. С учетом того, что все указанные молекулы относятся к числу основных эндотелиальных цитокинов [39, 40], данные наблюдения подтверждают результаты биоинформатического анализа, предполагающие достаточно высокую базальную секрецию цитокинов ЭК-ВГА. В сравнении с контрольными культурами воздействие первичных кальципротеиновых частиц (моделирующих умеренную дисфункцию эндотелия) и вторичных кальципротеиновых частиц (моделирующих выраженную дисфункцию эндотелия) приводило к повышению экспрессиикратно большего количества провоспалительных цитокинов в ЭК-КА (12 и 30 при воздействии первичных и вторичных кальципротеиновых частиц соответственно), чем в ЭК-ВГА (5 и 10 соответственно), что свидетельствовало о меньшей устойчивости ЭК-КА (и, соответственно, о более высокой устойчивости ЭК-ВГА) к развитию дисфункции эндотелия.

Заключение

Культуральная среда от дисфункциональных ЭК отличается повышенным содержанием рецепторных маркеров эндотелиального фенотипа и сниженным содержанием компонентов базальной мембраны и субэндотелиального внеклеточного матрикса в сравнении со средой от контрольных ЭК. Содержание ангиогенных молекул, белков сигнальных путей активации и агрегации тромбоцитов и свертывания крови и белков окислительного и эндоплазматического стресса в среде от дисфункциональных и контрольных ЭК было приблизительно схожим. Молекулярный профиль культуральной среды от ЭК-КА был более схожим с дисфункциональным в сравнении с ЭК-ВГА, отличаясь повышенным содержанием растворимых форм интегринов и сниженным содержанием ком-

понентов эндотелиальной базальной мембраны. Напротив, молекулярный профиль культуральной среды от ЭК-ВГА был более схожим с таковым у интактных ЭК и характеризовался более высокой представленностью компонентов сигнального пути Notch, сигнальных путей пролиферации, компонентов внеклеточного матрикса и провоспалительных белков. Многопараметрическое профилирование провоспалительных цитокинов в культуральной среде подтвердило их более высокую базальную секрецию в ЭК-ВГА в сочетании с более высокой устойчивостью ЭК-ВГА к развитию дисфункции эндотелия при ее моделировании, одновременно свидетельствуя о более выраженной провоспалительной активации ЭК-КА при воздействии модельных триггеров дисфункции эндотелия.

Конфликт интересов

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

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

Степанов Александр Денисович, 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** 0009-0009-7947-5917

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

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

Юрьева заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.И. Лазебная заявляет об отсутствии конфликта интересов. Е.А. Репкин заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Г. Кутихин входит в редакционную коллегию журнала «Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний».

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/>.

Благодарности

Ультравысокоэффективная жидкостная хроматография, совмещенная с тандемной масс-спектрометрией (УФЭЖХ-МС/МС), была проведена на оборудовании Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ.

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

Stepanov Alexander D., BSc, Junior Researcher, Laboratory of 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** 0009-0009-7947-5917

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

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

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

Кабилев Марсель Расимович, руководитель центра коллективного пользования «Геномика» федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-2777-0833

Тупикин Алексей Евгеньевич, научный сотрудник центра коллективного пользования «Геномика» федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-8194-0322

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

Вклад авторов в статью

МВЕ – 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

САД – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение, анализ и интерпретация данных, написание 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

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

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

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

Kabilov Marsel R., Head of the Genomics Core Facility, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-2777-0833

Tupikin Alexey E., Research Fellow, Genomics Core Facility, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-8194-0322

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; Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

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

HSDK – 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

SAD – 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

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

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

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

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

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

ЮЮО – 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

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

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

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

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

KAG – 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 / 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. Amersfoort J, Eelen G, Carmeliet P. Immunomodulation by endothelial cells - partnering up with the immune system? *Nat Rev Immunol*. 2022; 22(9):576-588. doi: 10.1038/s41577-022-00694-4.
3. 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.
4. 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.
5. Goncharov NV, Popova PI, Kudryavtsev IV, Golovkin AS, Savitskaya IV, Avdonin PP, Korf EA, Voitenko NG, Belinskaia DA, Serebryakova MK, Matveeva NV, Gerlakh NO, Anikievich NE, Gubatenko MA, Dobrylko IA, Trulioff AS, Aquino AD, Jenkins RO, Avdonin PV. Immunological Profile and Markers of Endothelial Dysfunction in Elderly Patients with Cognitive Impairments. *Int J Mol Sci*. 2024; 25(3):1888. doi: 10.3390/ijms25031888.
6. Corban MT., Prasad A, Nesbitt L, Loeffler D, Herrmann J, Lerman LO, Lerman A. Local Production of Soluble Urokinase Plasminogen Activator Receptor and Plasminogen Activator Inhibitor-1 in the Coronary Circulation Is Associated With Coronary Endothelial Dysfunction in Humans. *J Am Heart Assoc*. 2018; 7(15):e009881. doi: 10.1161/JAHA.118.009881.
7. Shishkova D, Markova V, Markova Y, Sinitsky M, Sinitskaya A, Matveeva V, Torgunakova E, Lazebnaya A, Stepanov A, Kutikhin A. Physiological Concentrations of Calciprotein Particles Trigger Activation and Pro-Inflammatory Response in Endothelial Cells and Monocytes. *Biochemistry (Mosc)*. 2025; 90(1):132-160. doi: 10.1134/S0006297924604064.
8. Stepanov A, Shishkova D, Markova V, Markova Y, Frolov A, Lazebnaya A, Oshchepkova K, Perepletchikova D, Smirnova D, Basovich L, Repkin E, Kutikhin A. Proteomic Profiling of Endothelial Cell Secretomes After Exposure to Calciprotein Particles Reveals Downregulation of Basement Membrane Assembly and Increased Release of Soluble CD59. *Int J Mol Sci*. 2024; 25(21):11382. doi: 10.3390/ijms252111382.
9. Gomez Toledo A, Golden GJ, Cummings RD, Malmström J, Esko JD. Endothelial Glycocalyx Turnover in Vascular Health and Disease: Rethinking Endothelial Dysfunction. *Annu Rev Biochem*. 2025; 94(1):561-586. doi: 10.1146/annurev-biochem-032620-104745.
10. 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.
11. Shishkova D, Lobov A, Zainullina B, Matveeva V, Markova V, Sinitskaya A, Velikanova E, Sinitsky M, Kanonykina A, Dyleva Y, Kutikhin A. Calciprotein Particles Cause Physiologically Significant Pro-Inflammatory Response in Endothelial Cells and Systemic Circulation. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(23):14941. doi: 10.3390/ijms232314941.
12. Sinitsky M, Repkin E, Sinitskaya A, Markova V, Shishkova D, Barbarash O. Proteomic Profiling of Endothelial Cells Exposed to Mitomycin C: Key Proteins and Pathways Underlying Genotoxic Stress-Induced Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2024; 25(7):4044. doi: 10.3390/ijms25074044.
13. 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.
14. 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.
15. Guzik TJ, Nosalski R, Maffia P, Drummond GR. Immune and inflammatory mechanisms in hypertension. *Nat Rev Cardiol*. 2024; 21(6):396-416. doi: 10.1038/s41569-023-00964-1.

Для цитирования: Маркова В.Е., Шишкова Д.К., Степанов А.Д., Фролов А.В., Юрьева Ю.О., Лазебная А.И., Репкин Е.А., Кутихин А.Г. Сравнительный анализ качественного и количественного состава молекул, выделяемых первичными эндотелиальными клетками коронарной и внутренней грудной артерии человека в физиологическом и дисфункциональном состоянии. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2025;14(5): 210-235. DOI: 10.17802/2306-1278-2025-14-5-210-235

To cite: Markova V.E., Shishkova D.K., Stepanov A.D., Frolov A.V., Yurieva Yu.O., Lazebnaya A.I., Repkin E.A., Kutikhin A.G. Secretome of primary human coronary artery and intrnal thoracic artery endothelial cells at physiological state and at endothelial dysfunction. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2025;14(5): 210-235. DOI: 10.17802/2306-1278-2025-14-5-210-235