

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ПЕРВИЧНЫХ АРТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В ФИЗИОЛОГИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ НА ОСНОВАНИИ МУЛЬТИОМИКСНЫХ ДАННЫХ

В.Е. Маркова¹, Д.К. Шишкова¹, А.Д. Степанов¹, А.В. Фролов¹, Е.С. Изотова¹, Ю.О. Юрьева¹, А.И. Лазебная¹, Е.А. Репкин², М.Р. Кабилов³, А.Е. Тупикин³, А.Г. Кутихин¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», бульвар им. академика Л.С. Барбараша, стр. 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002; ² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (СПбГУ), Университетская набережная, 7–9, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 199034; ³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН), проспект академика Лаврентьева, 8, Новосибирск, Российская Федерация, 630090

Основные положения

- Маркерами эндотелиального фенотипа с наиболее высоким уровнем содержания в секрете и внутриклеточном протеоме интактных ЭК-КА и ЭК-ВГА являются vWF, EPCR/CD201, MSAM/CD146, ICAM2/CD102, VE-кадгерин/CDH5/CD144 и PECAM1/CD31, при этом две трети маркеров эндотелиального фенотипа (около 30 из 45) выделяются в микроокружение ЭК даже в интактном состоянии.
- Интактные ЭК обладают относительно низкой базальной провоспалительной активностью, однако обладают высоким потенциалом патологической активации при воздействии соответствующих стимулов вследствие многообразия экспрессируемых генов индуцибельных цитокинов, а также высокой скорости выделения данных провоспалительных молекул в микроокружение после их синтеза внутри клетки.
- Высокая доля выделяемых белков эндотелиальной базальной мембраны и субэндотелиального внеклеточного матрикса от синтезируемых подтверждает принципиальную важность ЭК для формирования и динамической регуляции качественного и количественного состава данных структур.

Цель

Провести объективный биоинформатический анализ молекулярного фенотипа интактных эндотелиальных клеток атерочувствительной коронарной артерии (ЭК-КА) и эндотелиальных клеток атерорезистентной внутренней грудной артерии (ЭК-ВГА).

Материалы и методы

Выполнено полнотранскриптомное секвенирование лизата ЭК-КА и ЭК-ВГА и ультравысокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией лизата и культуральной среды от ЭК-КА и ЭК-ВГА. В качестве метрики генной экспрессии было установлено среднее значение количества транскриптов на миллион прочтений. В качестве метрики белковой экспрессии была установлена площадь хроматографических пиков, по которым осуществляли идентификацию обнаруженных белков в образцах. Анализ биоинформатических категорий в транскриптомных и протеомных данных проводили с использованием баз данных Gene Ontology и Reactome.

Результаты

Маркерами эндотелиального фенотипа с наиболее высоким уровнем содержания в секрете и внутриклеточном протеоме интактных ЭК артерий были vWF, EPCR/CD201, MSAM/CD146, ICAM2/CD102, VE-кадгерин/CDH5/CD144 и PECAM1/CD31, при этом 30 из 45 маркеров эндотелиального фенотипа выделялись в микроокружение ЭК даже в интактном состоянии. Большинство эндотелиальных молекул клеточной адгезии обладали низкой базальной экспрессией и являлись индуцибельными (ICAM1, NRCAM, ALCAM, SELE, VCAM1). Хотя ЭК артерий экспрессировали около 40 генов цитокинов, лишь около 10 из них синтезировались в относительно значимых количествах (включая MIF, PTX3, CSF1, CCL2, CCL14, IL-8/CXCL8 и CXCL1).

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

Corresponding author: Victoria E. Markova, marvika97@gmail.com; address: 6, Academician L.S. Barbarash Boulevard, Kemerovo, Russian Federation, 650002

ЭК характеризовались высокой экспрессией и выделением практически всех компонентов базальной мембраны (около 20), а также значительного количества компонентов внеклеточного матрикса (около 65). В культуральной среде от ЭК детектировали около 50 ангиогенных и около 65 гемостатических молекул. Большое количество транскрибируемых генов и синтезируемых белков вазодилатационных сигнальных путей в сравнении с вазоконстрикционными указывало на более активное участие интактных ЭК в вазодилатации. При анализе указанных функциональных классов отмечалась согласованность экспрессии большинства молекул на уровне транскриптома, протеома и секретома.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о высокой базальной биоактивности ЭК в контексте поддержания ими ангиогенеза, гемостаза, синтеза компонентов эндотелиальной базальной мембраны и субэндотелиального внеклеточного матрикса, а также о низкой базальной провоспалительной активности ЭК в сочетании с высоким потенциалом их патологической активации при воздействии соответствующих стимулов.

Ключевые слова

Эндотелиальные клетки • Коронарная артерия • Внутренняя грудная артерия • Физиологический фенотип • Маркеры эндотелиального фенотипа • Базальная мембрана • Провоспалительные цитокины

Поступила в редакцию: 01.03.2026; поступила после доработки: 27.03.2026; принята к печати: 14.04.2026

BIOINFORMATIC, MULTI-OMICS ANALYSIS OF INTACT ARTERIAL ENDOTHELIAL CELLS

V.E. Markova¹, D.K. Shishkova¹, A.D. Stepanov¹, A.V. Frolov¹, E.S. Izotova¹, Yu.O. Yurieva¹, A.I. Lazebnaya¹, E.A. Repkin², M.R. Kabilov³, A.E. Tupikin³, A.G. Kutikhin¹

¹ Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", 6, Academician L.S. Barbarash Boulevard, Kemerovo, Russian Federation, 650002; ² Saint Petersburg State University, 7–9 Universitetskaya Embankment, Saint Petersburg, Russian Federation, 199034; ³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 8 Akademika Lavrentieva Avenue, Novosibirsk, Russian Federation, 630090

Highlights

- The most expressed endothelial phenotype markers are vWF, EPCR/CD201, MCAM/CD146, ICAM2/CD102, VE-cadherin/CDH5/CD144, and PECAM1/CD31; two-thirds of endothelial phenotype markers (30/45) are released into the extracellular space even without any stimulation.
- Intact endothelial cells exhibit low basal pro-inflammatory activity, yet having a high potential for pathological activation in response to appropriate stimuli due to the broad expression of inducible cytokine genes and because of rapid secretion of these molecules into the microenvironment.
- The high proportion of secreted proteins composing endothelial basement membrane and subendothelial extracellular matrix relative to the total amount synthesized confirms the pivotal role of endothelial cells in the formation of these histological structures.

Aim

To perform an unbiased bioinformatic analysis of the molecular phenotype of intact endothelial cells derived from the atherosusceptible coronary artery (HCAEC) and the atheroresistant internal mammary artery (HITAEC).

Methods

Lysates of HCAEC and HITAEC were analyzed by whole transcriptome sequencing (RNA-seq) and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Conditioned medium from HCAEC and HITAEC was also analyzed by UHPLC-MS/MS. Mean transcripts per million was used as the metric of gene expression, whilst protein expression was quantified based on chromatographic peak areas. Bioinformatic analysis of transcriptomic and proteomic data was performed using the Gene Ontology and Reactome databases.

Results

The most highly expressed endothelial phenotype markers in secretome and intracellular proteome of intact arterial ECs were vWF, EPCR/CD201, MCAM/CD146, ICAM2/CD102, VE-cadherin/CDH5/CD144, and PECAM1/CD31. Notably, 30 out of 45 endothelial phenotype markers were released into the extracellular microenvironment even without pathological activation. Most endothelial cell adhesion molecules exhibited low basal expression and were inducible (ICAM1, NRCAM, ALCAM, SELE, VCAM1). Although arterial ECs expressed approximately 40 cytokine genes, only about 10 were synthesized and released at relatively significant levels (including MIF, PTX3, CSF1, CCL2, CCL14, IL-8/CXCL8, and CXCL1). ECs demonstrated high expression and secretion of almost all basement membrane components (approximately 20), as well as a substantial number of extracellular matrix components (approximately 65). Approximately 50 angiogenic and 65 hemostatic molecules were detected in the conditioned media of ECs. Higher number of transcribed genes and synthesized proteins involved in vasodilatory pathways compared to vasoconstrictive pathways indicated a more prominent role of intact ECs in vasodilation.

Conclusion

Intact ECs have high basal bioactivity in maintaining angiogenesis, hemostasis, and the synthesis of endothelial basement membrane and subendothelial extracellular matrix components. Albeit intact ECs exhibit low basal pro-inflammatory activity, they have a high potential for pathological activation in response to the respective stimuli.

Keywords

Endothelial cells • Coronary artery • Internal thoracic artery • Physiological phenotype • Endothelial phenotype markers • Basement membrane • Pro-inflammatory cytokines

Received: 01.03.2026; received in revised form: 27.03.2026; accepted: 14.04.2026

Список сокращений

ВГА	– внутренняя грудная артерия	ЭК	– эндотелиальные клетки
КА	– коронарная артерия	NO	– оксид азота
УВЭЖХ-МС/МС	– ультравысокоэффективная жидкостная хроматография, совмещенная с тандемной масс-спектрометрией		

Введение

Эндотелиальные клетки (ЭК) являются ключевым компонентом гомеостаза сердечно-сосудистой системы, формируя полупроницаемый барьер между циркулирующей кровью и биологическими тканями, обеспечивая атромбогенность течения крови по сосудам, регулируя артериальное давление путем выделения широкого спектра вазоконстрикторов и вазодилататоров, обеспечивая ветвление новых кровеносных сосудов из уже имеющихся и поддерживая иммунный ответ посредством базальной секреции ряда провоспалительных цитокинов [1, 2]. Каждая из этих функций реализуется посредством экспрессии различных функциональных классов молекул – белками межэндотелиальных контактов (плотных – окклюдин, клаудины и молекулы семейств JAM и ZO, адгезивных – кадгерина, и щелевых – коннексины) и контактов ЭК с базальной мембраной (интегрины), белками сигнальных путей гемостаза, вазоактивными медиаторами, белками сигнальных путей ангиогенеза и провоспалительными цитокинами [3–5]. Соответственно, классификация молекул эндотелия

по структурным и функциональным признакам является необходимым условием для системного изучения протекающих в ЭК процессов. Не менее важным является анализ относительных уровней экспрессии молекул внутри одного функционального класса [1–5]. Некоторые из функциональных классов эндотелиальных молекул характеризуются конститутивной экспрессией (в частности, маркеры эндотелиального фенотипа), поскольку они совершенно необходимы для нормального функционирования эндотелия [6, 7]. Другие – к примеру, индуцибельные молекулы клеточной адгезии – в норме экспрессируются лишь в минимальных количествах, однако их синтез резко усиливается при провоспалительной активации эндотелия [6, 7]. Такое ранжирование позволяет отличать физиологическое состояние ЭК от патологического, а также использовать некоторые из этих молекул в качестве патофизиологически и клинически релевантных маркеров дисфункции эндотелия.

Использование высокопроизводительных методов исследования – в частности, полнотранскриптомного секвенирования и ультравысокоэф-

фективной жидкостной хроматографии, совмещенной с тандемной масс-спектрометрией (УВЭЖХ-МС/МС) – позволяет провести объективный анализ молекулярного фенотипа ЭК, открывая возможности для создания соответствующего молекулярного атласа. Преимуществом применения полнотранскриптомного секвенирования является абсолютное покрытие всех экспрессируемых генов и некодирующих РНК, что является существенным преимуществом при анализе молекулярной эволюции. При этом на практике уровень экспрессии генов не всегда напрямую отражает уровень экспрессии соответствующих белков, что ограничивает функциональную интерпретацию данных и требует использования протеомного профилирования. УВЭЖХ-МС/МС, в свою очередь, позволяет детектировать лишь ограниченное количество белков (до 4 000), однако эти данные надежно отражают текущее функциональное состояние клетки вследствие того, что именно белок является основной сигнальной молекулой в биохимии клетки. Кроме того, УВЭЖХ-МС/МС позволяет анализировать не только лизат клеток, но и их секретом (совокупность молекул, выделяемых ими в микроокружение). Сочетанное применение данных методов обеспечивает высокую чувствительность и специфичность при определении молекулярного фенотипа ЭК. В контексте физиологии эндотелия особый интерес представляет анализ молекулярного профиля ЭК коронарной артерии (ЭК-КА) и ЭК внутренней грудной артерии (ЭК-ВГА), первая из которых чувствительна, а вторая – устойчива к развитию атеросклероза [8]. Мультиомиксный анализ лизатов ЭК-КА и ЭК-ВГА выявил лишь ограниченную молекулярную гетерогенность между данными типами ЭК [9]; сокультивирование ЭК-КА и ЭК-ВГА улучшало эндотелиальный гомеостаз в сравнении с сокультивированием ЭК-КА с эндотелиальными клетками большой подкожной вены, что также свидетельствует о сопоставимости их молекулярного профиля и возможности его сочетанного анализа без избыточной стратификации [10, 11].

Исследование молекулярного фенотипа интактных ЭК с использованием высокопроизводительных (омиксных) методов является обязательной предпосылкой для аналогичного объективного анализа дисфункциональных ЭК и поиска релевантных молекулярных мишеней для эндотелиопротективной терапии [12–15]. Кроме того, анализ молекулярного фенотипа ЭК в физиологическом состоянии необходим для последующего сопоставления с фенотипами стареющих ЭК на последовательных пассажах с учетом растущей актуальности изучения молекулярных закономерностей физиологического и патологического старения ЭК и вклада данного процесса в развитие дисфункции эндотелия [16–24]. В частности, старение ЭК приводит к

нарушению барьерной функции и к провоспалительной активации эндотелия легких и головного мозга [16, 17], а также к нарушению ангиогенной функции ЭК [18]. Идентификация различий между молекулярными фенотипами интактных и стареющих ЭК может объяснить вклад последних в развитие хронического низкоинтенсивного системного воспаления, артериальной гипертензии, нарушений микроциркуляции, атеросклероза и тромбоза поверхностных и глубоких вен, а также содействовать расшифровке молекулярных основ сниженной устойчивости ЭК к системным метаболическим нарушениям (дислипидемии, гипергликемии, уремии и азотемии) [19–21]. Следует отметить, что объективное молекулярное фенотипирование ЭК требует применения высокопроизводительных (омиксных) методов анализа.

С целью анализа молекулярного фенотипа интактных первичных ЭК-КА и ЭК-ВГА в интактном состоянии были выполнены полнотранскриптомное секвенирование и УВЭЖХ-МС/МС, для анализа протеома и секретома. Проведенное мультиомиксное исследование позволило сопоставить результаты анализа геной экспрессии (транскриптома), экспрессии белков внутри ЭК (внутриклеточного протеома) и качественного и количественного состава белков, выделяемого ЭК в микроокружение (их секретом). Исследование ставило перед собой решение следующих задач: 1) выделение функциональных классов молекул, важных для нормального функционирования ЭК, для их последующей оценки при биоинформатическом анализе; 2) проведение биоинформатического анализа данных полнотранскриптомного секвенирования ЭК-КА и ЭК-ВГА для определения экспрессии генов, кодирующих молекулы вышеуказанных функциональных классов; 3) проведение биоинформатического анализа данных протеомного профилирования ЭК-КА и ЭК-ВГА для определения экспрессии белков вышеуказанных функциональных классов в лизате и в микроокружении ЭК.

Материалы и методы

Культивирование ЭК-КА и ЭК-ВГА

Первичные культуры ЭК-КА (300К-05а, Cell Applications) и ЭК-ВГА (308К-05а, Cell Applications) культивировали во флаконах T-75 (708003, Wuxi NEST Biotechnology) в питательной среде EndoBoost (EB1, AppScience Products) до достижения конfluence. Пассажиrowание ЭК-КА и ЭК-ВГА осуществляли с использованием раствора трипсина (0,25%) и этилендиаминтетрауксусной кислоты (0,53 ммоль/л) с солями Хэнкса без кальция и магния (трипсин-ЭДТА, П043п, ПанЭко) для открепления ЭК от культурального пластика и с применением 10% фетальной бычьей сыворотки (1.1.6.1, Биолот) для ингибирования трипсина по-

сле получения суспензии ЭК. Дальнейшее культивирование ЭК-КА и ЭК-ВГА в 6-луночных планшетах (703001, Wuxi NEST Biotechnology), флаконах T-25 (079025, Biologix Plastic) или флаконах T-75 (07-8075, Biologix Plastic) также осуществляли в среде EndoBoost до достижения конfluence (≈ 0,5 × 10⁶ клеток на лунку 6-луночного планшета, ≈ 1 × 10⁶ клеток на флакон T-25 и ≈ 3 × 10⁶ клеток на флакон T-75). Непосредственно перед сбором РНК и белка ЭК-КА и ЭК-ВГА дважды промывали теплым (≈ 37 °С) раствором фосфатно-солевого буфера по Дульбекко без кальция и магния с рН = 7.4 (1.2.4.7, Биолот), после чего среду EndoBoost заменяли на бессывороточную среду EndoLife (EL1, AppScience Products). Визуальное наблюдение за культурами ЭК осуществляли посредством фазово-контрастной микроскопии (AxioObserver. Z1, Carl Zeiss). Культивирование ЭК-КА и ЭК-ВГА осуществляли в параллели.

Для выделения РНК и белка с целью выполнения полнотранскриптомного секвенирования и УВЭЖХ-МС/МС конfluence (≈ 0,5 × 10⁶ клеток на лунку 6-луночного планшета) культуры ЭК-КА и ЭК-ВГА (для выделения РНК: n = 4 для каждого типа ЭК, всего n = 8; для выделения белка из лизата ЭК: n = 9 для каждого типа ЭК, всего n = 18; для выделения белка из культуральной среды от ЭК: n = 5 для каждого типа ЭК, всего n = 10) инкубировали в среде EndoLife в течение 24 часов. Визуальное наблюдение за культурами ЭК осуществляли посредством фазово-контрастной микроскопии. После завершения инкубации среду центрифугировали при 220 × g для осаждения клеток, аликвотировали, центрифугировали при 2 000 × g для осаждения клеточного дебриса, переносили в пробирки с предварительной гидрофобной обработкой для низкого связывания белка и замораживали при –80 °С.

Полнотранскриптомное секвенирование (RNA-seq)

Для проведения полнотранскриптомного секвенирования ЭК-КА и ЭК-ВГА лизировали тризолом (15596018, Thermo Fisher Scientific) с последующим выделением РНК при помощи соответствующего набора реагентов (12183016, Thermo Fisher Scientific) с сопутствующей обработкой ДНКазой (DNASE70, Sigma-Aldrich). Контроль качества РНК осуществляли с помощью соответствующего набора реагентов (5067-1513, Agilent Technologies) на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) по индексу целостности РНК. Оценку количества выделенной РНК проводили на спектрофотометре для микрообъемов (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) и флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific). Для 1 мкг выделенной РНК проводили деплецию рРНК посредством соответствующего набора реагентов (037.96, Lexogen) с дальнейшим

конструированием ДНК-библиотек при помощи соответствующего набора реагентов (042.96, Lexogen). Для каждого образца РНК использовали определенный баркод. Качество полученных ДНК-библиотек анализировали с помощью соответствующего набора реагентов (5067-4626, Agilent Technologies) на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Концентрацию ДНК-библиотек определяли с помощью количественной полимеразной цепной реакции с детекцией результата в реальном времени (CFX96 Touch, Bio-Rad). Далее ДНК-библиотеки смешивали эквимолярно и проводили высокопроизводительное секвенирование с длиной парно-концевых прочтений 2 × 125 нуклеотидов (HiSeq 2000, Illumina). Полученные прочтения фильтровали по качеству (QV > 20), длине (> 20) и удаляли адаптерную последовательность с помощью программы TrimGalore (версия 0.4.4, Vabraham Bioinformatics). После фильтрации среднее количество прочтений превышало 10 × 10⁶. Картирование прочтений на геном человека (hg38) с аннотацией Ensembl (v.38.93) проводили в программе CLC Genomics Workbench 11.0 (Qiagen) при дефолтных параметрах картирования.

Ультравысокоэффективная жидкостная хроматография, совмещенная с тандемной масс-спектрометрией (УФЭЖХ-МС/МС)

Для УФЭЖХ-МС/МС ЭК-КА и ЭК-ВГА лизировали RIPA-буфером (89901, Thermo Fisher Scientific) с коктейлем ингибиторов протеаз и фосфатаз (78444, Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. Для очистки от компонентов RIPA-буфера проводили осаждение белка. Пробу инкубировали в течение часа при –20 °С в четырех объемах ацетона (650501, Sigma-Aldrich), после чего центрифугировали при 13 000 × g в течение 15 минут при 4 °С (Microfuge 20R, Beckman Coulter). Осадок ресуспендировали в 250 мкл ледяного ацетона (650501, Sigma-Aldrich) и инкубировали в течение 15 минут при –20 °С. Далее проводили повторное центрифугирование (13 000 × g в течение 15 минут при 4 °С) с последующим удалением надосадка. Для полного удаления ацетона пробирки сушили на воздухе в течение 5–10 минут. Осажденный белок ресуспендировали в мочеvine (8 моль/л, U5128, Sigma-Aldrich), разведенной в бикарбонате аммония (50 ммоль/л, 09830, Sigma-Aldrich), и инкубировали в течение 20 минут на льду, после чего образцы подвергали ультразвуковой обработке в ледяной ванне (Сапфир) в течение 15 минут и инкубировали еще 10 минут на льду при периодическом перемешивании.

Для исследований образцы выравнивали по общему количеству белка. Измерение концентрации белка проводили соответствующим набором (25102, Lumiprobe) на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher

Scientific) согласно протоколу производителя. Образцы белка (15 мкг) инкубировали с дитиотрептоном (5 ммоль/л, D0632, Sigma-Aldrich) в течение 1 часа при 37 °C с последующей инкубацией в 2-йодоацетамиде (15 ммоль/л, I1149, Sigma-Aldrich) в течение 30 минут при комнатной температуре без доступа света. Далее образцы разводили в 7 объемах бикарбоната аммония (50 ммоль/л), добавляли 300 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) в течение 3 часов и растворяли в 20 мкл муравьиной кислоты в концентрации 0,1% (1000291000, Sigma-Aldrich) для последующего протеомного анализа. Растворенные пептиды далее анализировали при помощи безметочного протеомного профилирования, выполняемого посредством УВЭЖХ-МС/МС с ионной подвижностью (≈ 500 нг пептидов на каждый образец).

Хроматографическое разделение проводили на нанопоточном хроматографе nanoElute (Bruker) с трэп-колоной 5 мм (174500, Thermo Fisher Scientific) и хроматографической колоной (Bruker Fifteen, C18 ReproSil AQ, 150 \times 0,75 мм, 1,9 мкм, 120 Å; Bruker) в градиенте вода/ацетонитрил в присутствии 0,1% муравьиной кислоты при температуре 50 °C со скоростью потока 400–500 нл/мин (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. В качестве хроматографического детектора использовали электроспрейный орбитрап-времяпролетный масс-спектрометр высокого разрешения с ячейкой измерения ионной подвижности timsTOF Pro (Bruker). Масс-спектрометр использовали в PASEF-режиме положительной полярности дата-зависимой тандемной масс-спектрометрии с временем PASEF-цикла 0,5 секунды. Молекулы с ионной подвижностью от 0,85 до 1,30 1/К0 аккумулялировали 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 тандемной масс-спектрометрии (МС/МС). Для фрагментации использовали ионы не менее чем с двумя зарядами в диапазоне m/z от 100 до 1800.

Биоинформатический анализ

Статистический анализ и визуализацию транскриптомных данных проводили с использованием языка программирования R (версия 4.3.2) в интегрированной среде разработки RStudio (версия 2025.09.0). Общее количество идентифицированных генов составило 18310. В качестве метрики генной экспрессии в ЭК было установлено среднее значение количества транскриптов на миллион прочтений (transcripts per million, TPM).

Протеомные (масс-спектрометрические) данные обрабатывали с использованием программного обеспечения PEAKS Studio Xpro (Bioinformatics Solutions). 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. Для идентификации использовали спектры с качеством сборки de novo не менее 50%. Достоверными считали идентификации белков и пептидов со средней долей ложных отклонений гипотез (FDR) $< 1\%$ и $< 0,1\%$ соответственно, расчёт FDR проводили при помощи поиска по обратной базе данных. 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 разных образцах, проводили анализ полученных данных. Для визуализации протеомных данных и результатов их статистического анализа использовали библиотеку “rheatmap” (версия 1.0.13) для языка программирования R (версия 4.3.2) в интегрированной среде разработки RStudio (версия 2025.09.0).

В качестве метрики для анализа содержания белков в R была установлена площадь хроматографических пиков, по которым осуществляли идентификацию обнаруженных белков в различных образцах. Для обеспечения надлежащего качества данных использовали исключительно белки, определенные не менее чем в 70% образцов. Отсутствующие данные заполняли с использованием метода k-ближайших соседей при помощи пакета “impute” (версия 1.78.0). Общее количество всех идентифицированных белков составило 3 147 (2 986 в лизированных ЭК и 1 246 в культуральной среде от них, из которых 1085 белков детектировали и в лизированных ЭК, и в среде, 1 901 белок определяли исключительно в лизированных ЭК, а 161 белок – исключительно в среде).

Анализ биоинформатических категорий в транскриптомных и протеомных данных проводили с использованием баз данных Gene Ontology (<https://geneontology.org/>) и Reactome (<https://reactome.org/>). В рамках биоинформатического анализа дисфункции эндотелия молекулы классифицировали по следующим группам: 1) маркеры эндотелиального фенотипа (ANGPT2, ANGPTL2, BMX, BSG, CAVIN1, CAVIN2, CAVIN3, CDH5, CLDN5, CLEC14A, ECE1, EDF1, ENG, EPHB2, EPHB4, ERG, ESAM, ESM1, F11R, FLI1, GJA1, ICAM1, ICAM2, ITGA2, ITGA3, ITGA5, ITGAV, ITGB1, ITGB3, ITGB5, KDR, MCAM, NOS3, NOTCH1, NRP1, NRP2, PECAM1, PODXL, PROCR, PTPRB, STAB1, TEK, TIE1, TJP1, VWF, определенные по результатам анализа литературы); 2) прочие белки межэндотелиальных контактов ЭК с эндотелиальной базальной мембраной (интегрины), плотных межэндотелиальных контактов (окклюдин, клаудины и молекулы семейств JAM и ZO), адгезивных межэндотелиальных контактов (кадгерины) и щелевых межэндотелиальных контактов (коннексины); 3) молекулы клеточной адгезии (ALCAM, VCAM, SEACAM1, SEACAM19, SEACAM21, CERCAM, EPCAM, HERPACAM, ICAM1, ICAM2, ICAM3, ICAM4, ICAM5, LICAM, MADCAM1, MCAM, NCAM1, NCAM2, NRCAM, PECAM1, SELE, SELL, SELP, VCAM1, определенные по результатам анализа литературы); 4) провоспалительные цитокины (интерлейкины, хемокины классов CCL и CXCL, колониестимулирующие факторы, интерфероны, лимфотоксины, фактор ингибирования миграции макрофагов, пентраксин-3, трансформирующие факторы роста, фактор некроза опухоли); 5) белки внутриклеточных провоспалительных сигнальных каскадов (рецепторы распознавания паттернов, растворимые формы рецепторов к цитокинам, лиганды и рецепторы сигнального пути фактора некроза опухоли, внутриклеточные белки провоспалительных сигнальных путей, белки сигнального пути интерферонов и белки теплового шока); 6) белки эндотелиальной базальной мембраны (GO: 0005604); 7) белки субэндотелиального внеклеточного матрикса (GO: 0062023); 8) белки сигнальных путей ангиогенеза (GO:0001525); 9) белки сигнальных путей гемостаза (GO: 0070527, GO:0030168, GO:0007596); 10) белки сигнальных путей NO (R-HSA: 202131); 11) белки сигнальных путей вазодилатации (GO:0042311); 12) белки сигнальных путей вазоконстрикции (GO:0042310). Для анализа экспрессии молекул всех функциональных групп были построены тепловые карты.

Результаты

При сравнительном анализе экспрессии маркеров эндотелиального фенотипа было выявлено восемь молекул с преобладающей экспрессией как в белко-

вом лизате, так и в секретоме (vWF, EPCR/CD201, MCAM/CD146, ICAM2/CD102, VE-кадгерин/CDH5/CD144, PECAM1/CD31, CAVIN1 и CAVIN2, рис. 1). В секретоме ЭК было обнаружено 28 из 45 маркеров эндотелиального фенотипа, что указывает на активное выделение клетками их растворимых форм даже в интактном состоянии (рис. 1). При анализе транскриптома и протеома было выявлено аналогичное количество высокоэкспрессируемых маркеров эндотелиального фенотипа (29 и 30 соответственно), большинство из которых (24) пересекались с детектируемыми в секретоме (рис. 1). Интегринами с наиболее высоким уровнем содержания были ITGB1, ITGA5, ITGA2, ITGAV и ITGB3, из иных белков межэндотелиальных контактов – MCAM/CD146, ICAM2/CD102, VE-кадгерин/CDH5/CD144, PECAM1/CD31, F11R/JAM-A/CD321, BSG/CD147, ICAM1, ESAM, ZO-1/TJP1, PODXL и Cx43/GJA1 (рис. 1). Следует отметить устойчивую экспрессию генов транскрипционных факторов пан-эндотелиальной дифференцировки ERG и FLI1 и кодируемых ими белков (в особенности первого из них), а также стабильную, хотя и невысокую экспрессию гена и белка NOS3 (эндотелиальной NO-синтазы, рис. 1).

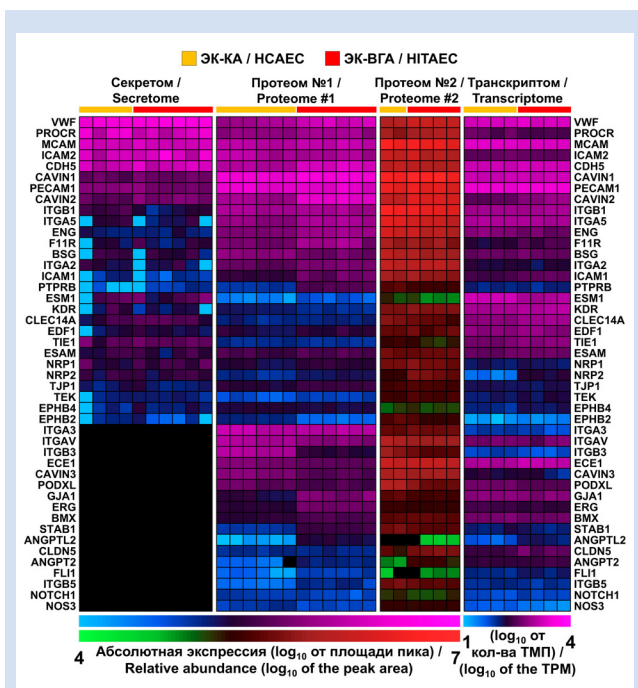


Рисунок 1. Тепловая карта, демонстрирующая экспрессию маркеров эндотелиального фенотипа в секретоме (культуральной среде), во внутриклеточном протеоме и в транскриптоме ЭК-КА и ЭК-ВГА, культивированных в бессывороточной культуральной среде EndoLife в течение 24 часов. Протеом № 1 и протеом № 2 представляют собой массивы данных из разных экспериментов, проведенных в разное время

Figure 1. Heat map demonstrating the expression of endothelial phenotype markers in secretome (cell culture supernatant), intracellular proteome, and transcriptome of human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) cultured in serum-free medium for 24 hours. Proteome #1 and proteome #2 represent datasets from different experiments conducted in distinct time periods

Также в культуральной среде от ЭК наблюдались относительно высокая экспрессия ангиогенных рецепторов (KDR/VEGFR2/CD309, NRP1, NRP2), экспрессия которых на геном и белковом уровне была весьма умеренной (рис. 1). Еще менее выраженной была экспрессия ангиопоэтинового рецептора Tie-2/TEK/CD202b и мембрансвязанных эфриновых рецепторов EPHB2 и EPHB4, растворимые формы которых также детектировали в секретоме ЭК (рис. 1). Ангиопоэтины (ANGPT2 и ANGPTL2) характеризовались относительно невысокой экспрессией внутри клетки и не обнаруживались в секретоме интактных ЭК (рис. 1). Из важных маркеров эндотелиального фенотипа, стабильно выделяемых ЭК в микроокружение, можно отметить ангиогенные молекулы ESM1 и CLEC14A, белок межэндотелиальных контактов ESAM и рецептор Tie-1, модулирующий связывание Tie-2 с ангиопоэтинами (рис. 1). Несмотря на высокую экспрессию указанных четырех белков на геномном уровне, во внутриклеточном протеоме высокая экспрессия отмечалась лишь для ESAM (рис. 1). Полученные результаты свидетельствуют о высокой экспрессии белков межэндотелиальных контактов, что связано с важностью ЭК для поддержания полупроницаемого барьера между системным кровотоком и тканями.

Дополнительный анализ белков межэндотелиальных контактов, не являющихся маркерами эндотелиального фенотипа, показал, что лишь 5 из них: Т-кадгерин (CDH13), ZO-2 (TJP2), мембрансвязанные ангиогенные эфрины (EFNA1, EFNB1, EFNB2) и их рецепторы (EPHA2), а также одна из субъединиц интегрина (ITGA6) синтезируются или выделяются ЭК в значительных количествах (рис. 2).

При анализе экспрессии молекул клеточной адгезии в секретоме, внутриклеточном протеоме и транскриптоме ЭК отмечался стабильно высокий уровень экспрессии MCAM/CD146, ICAM2/CD102 и PECAM1/CD31 (рис. 3). В культуральной среде от ЭК и внутри самих ЭК на геномном и белковом уровне также наблюдалась экспрессия молекул ICAM1, ALCAM и NRCAM (рис. 3). В секретоме также наблюдалась стабильная, хотя и невысокая экспрессия VCAM (рис. 3). Экспрессия всех остальных молекул клеточной адгезии, включая Е-селектин (SELE) и VCAM1, отмечалась исключительно на геномном уровне и была невысокой (рис. 3). Экспрессия гена ICAM1 стабильно превышала экспрессию генов SELE и VCAM1, при этом экспрессия гена SELE была стабильно выше, чем гена VCAM1, что согласуется с аналогичными результатами при анализе геномной экспрессии методом количественной полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции (рис. 3). На основании этих данных было сделано заключение о том, что большинство молекул клеточной адгезии обладает низкой базальной экспрессией и являются индуцибельными (рис. 3).

На следующем этапе была проведена оценка экспрессии провоспалительных цитокинов, к которым были отнесены интерлейкины, хемокины

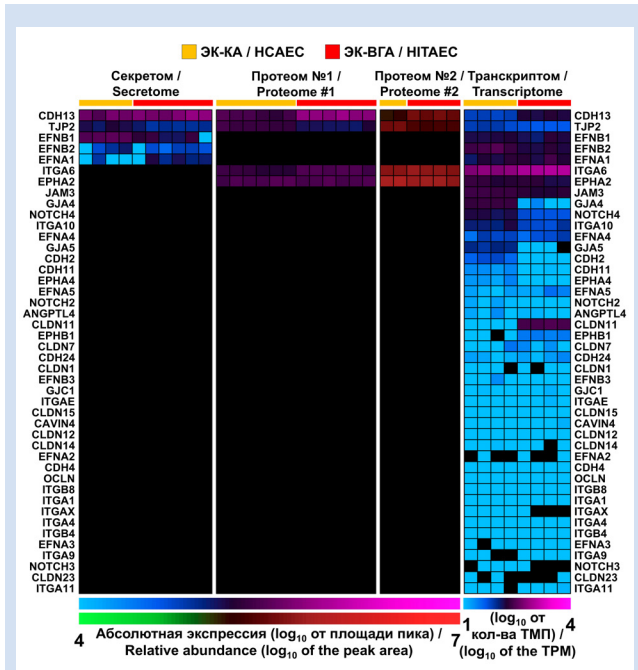


Рисунок 2. Тепловая карта, демонстрирующая экспрессию прочих белков межэндотелиальных контактов в секретоме (культуральной среде), во внутриклеточном протеоме и в транскриптоме ЭК-КА и ЭК-ВГА, культивированных в бессывороточной культуральной среде EndoLife в течение 24 часов. Протеом № 1 и протеом № 2 представляют собой массивы данных из разных экспериментов, проведенных в разное время

Figure 2. Heat map demonstrating the expression of endothelial cell junction proteins in secretome (cell culture supernatant), intracellular proteome, and transcriptome of human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) cultured in serum-free medium for 24 hours. Proteome #1 and proteome #2 represent datasets from different experiments conducted in distinct time periods

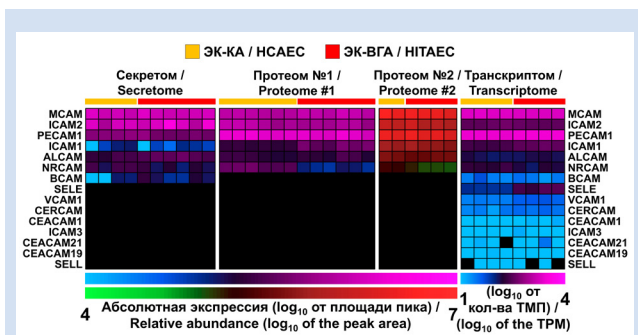


Рисунок 3. Тепловая карта, демонстрирующая экспрессию маркеров клеточной адгезии в секретоме (культуральной среде), во внутриклеточном протеоме и в транскриптоме ЭК-КА и ЭК-ВГА, культивированных в бессывороточной культуральной среде EndoLife в течение 24 часов. Протеом № 1 и протеом № 2 представляют собой массивы данных из разных экспериментов, проведенных в разное время

Figure 3. Heat map demonstrating the expression of cell adhesion proteins in secretome (cell culture supernatant), intracellular proteome, and transcriptome of human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) cultured in serum-free medium for 24 hours. Proteome #1 and proteome #2 represent datasets from different experiments conducted in distinct time periods

классов CCL и CXCL, колониестимулирующие факторы, интерфероны, лимфотоксины, фактор ингибирования миграции макрофагов, пентраксин-3, трансформирующие факторы роста и фактор некроза опухоли. Исследование культуральной среды от ЭК в базальном состоянии выявило экспрессию лишь 7 провоспалительных цитокинов (MIF, PTX3, CSF1, CCL2, CCL14, IL-8/CXCL8 и CXCL1), при этом в протеоме из них детектировались лишь MIF, PTX3 и TGFB1, рис. 4). На уровне генной экспрессии отмечали экспрессию около 40 цитокинов: фактора ингибирования миграции макрофагов (MIF), пентраксина-3 (PTX3), интерлейкинов (IL1A, IL7, IL12A, IL15, IL16, IL17D, IL23A, IL32, IL33), хемокинов (CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL10, CXCL11, CXCL16 и CCL2, CCL5, CCL14, CCL16, CCL20), колониестимулирующих факторов (CSF1, CSF2, CSF3), трансформирующих факторов роста (TGFB1, TGFB2 и TGFB3), лимфотоксина В (LTB) и ϵ -интерферона (IFNE) (рис. 4). При этом цитокины с наиболее активной экспрессией на генном уровне совпадали с детектируемыми в культуральной среде, кроме IL32, LTB и TGFB1 (рис. 4). Наиболее высокой и устойчивой экспрессией в секретоме и в протеоме обладали MIF и PTX3, на генном уровне – MIF, PTX3, CCL2, IL32 и LTB (рис. 4). Содержание цитокинов в культуральной среде превышало

такое в лизате ЭК, что согласуется с ранее полученными методом дот-блоттинга данными и гипотезой о том, что скорость выделения цитокинов в микроокружение и системный кровоток после их синтеза является достаточно высокой (рис. 4). Представленные результаты свидетельствуют об относительно низкой базальной провоспалительной активности ЭК, которая повышается лишь при воздействии соответствующих стимулов, вызывающих развитие патологической активации эндотелия. Тем не менее, ЭК характеризуются многообразием транскрибируемых генов цитокинов, что позволяет предположить их в качестве скрытого резервуара развития системного воспаления (что наблюдается у пациентов с COVID-19).

Далее был проведен анализ экспрессии белков внутриклеточных провоспалительных сигнальных каскадов, к которым были отнесены рецепторы распознавания паттернов, растворимые формы рецепторов к цитокинам, лиганды и рецепторы сигнального пути TNF, внутриклеточные белки провоспалительных сигнальных путей, белки сигнального пути интерферонов и белки теплового шока. В соответствии с небольшим числом выделяемых цитокинов, количество синтезируемых и выделяемых молекул этого функционального класса было невелико и составило 7 в секретоме (в том числе 6 белков теплового шока – HSP90AA1, HSPE1, HSPD1, HSPA4 и HSPH1) и 13 во внутриклеточном протеоме (включая HSPA13 и HSPA4L, рис. 5).

В соответствии с жизненно важной ролью эндотелиальной базальной мембраны ЭК характеризовались высокой экспрессией практически всех ее компонентов: остеонектина (SPARC), перлекана (HSPG2), фибронектина (FN1), субъединиц ламинина (LAMC1, LAMB1, LAMB2, LAMA4, LAMA5), нидогена-1 (NID1), субъединиц коллагена IV типа (COL4A1 и COL4A2), агрина (AGRN), гомолога лизилоксидазы (LOXL2), фибриллина-1 (FBN1), а также кальций-связывающего мембрансвязанного белка аннексина A2 (ANXA2, рис. 6). Наиболее высоким содержанием в секретоме характеризовались аннексин A2, остеонектин, перлекан, фибронектин и субъединицы ламинина, а также гомолог лизилоксидазы (LOXL2, рис. 6). Ранги экспрессии различных компонентов эндотелиальной базальной мембраны в значительной степени совпадали между секретомом, протеомом и транскриптомом, однако в секретоме и транскриптомом наиболее высокой экспрессией отличались остеонектин и перлекан, а в протеоме – аннексин A2 (рис. 6). Следует отметить высокую долю выделяемых белков эндотелиальной базальной мембраны от всех синтезируемых (рис. 6), что подтверждает принципиальную важность ЭК для формирования и динамической регуляции качественного и количественного состава эндотелиальной базальной мембраны. Ве-

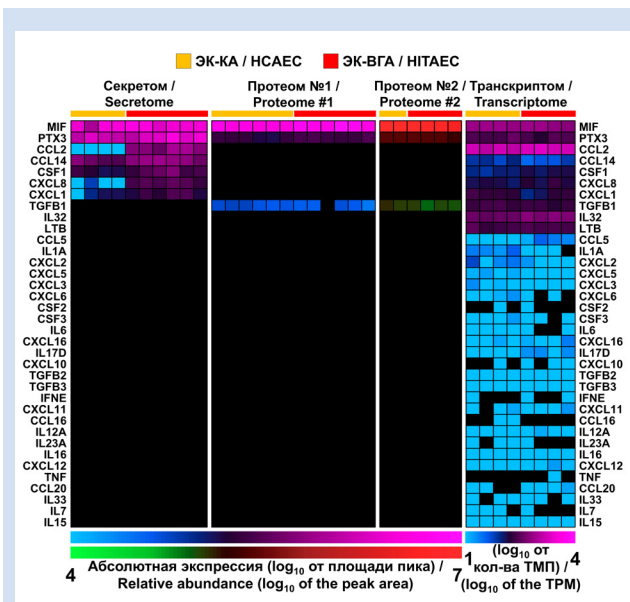


Рисунок 4. Тепловая карта, демонстрирующая экспрессию цитокинов в секретоме (культуральной среде), во внутриклеточном протеоме и в транскриптоме ЭК-КА и ЭК-ВГА, культивированных в бессывороточной культуральной среде EndoLife в течение 24 часов. Протеом № 1 и протеом № 2 представляют собой массивы данных из разных экспериментов, проведенных в разное время

Figure 4. Heat map demonstrating the expression of cytokines in secretome (cell culture supernatant), intracellular proteome, and transcriptome of human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) cultured in serum-free medium for 24 hours. Proteome #1 and proteome #2 represent datasets from different experiments conducted in distinct time periods

роятнее всего, физиологически это связано с отсутствием иных клеточных популяций вблизи эндотелиальной базальной мембраны в сколько-нибудь существенных количествах. Полученные результаты указывали на высокий синтетический потенциал ЭК, имеющий потенциально важное значение для тканевой инженерии, поскольку формирование базальной мембраны является обязательным условием для надлежащей адгезии ЭК и адекватного ангиогенеза, не сопровождающегося избыточной проницаемостью новообразованных капилляров. Можно предположить, что оценка культур первичных ЭК в отношении активности ими синтеза компонентов эндотелиальной базальной мембраны может коррелировать с успешностью эндотелизации и васкуляризации при их применении в тканеинженерных конструкциях.

По аналогии с активным синтезом белков эндотелиальной базальной мембраны, интактные ЭК синтезировали и выделяли в культуральную среду

значительное количество компонентов субэндотелиального внеклеточного матрикса (≈ 65 , рис. 7). Наиболее активно выделяемые белки субэндотелиального внеклеточного матрикса совпадали с наиболее активно формируемыми внутри клетки и наиболее активно транскрибируемыми (LGALS1, PSAP, THBS1, VWF, SERPINE1, EFEMP1, IGFBP7, CTSB, CALR, рис. 7). Из выделяемых в микроокружение белков субэндотелиального внеклеточного матрикса следует выделить: 1) белки, способствующие гемостазу: тромбоспондин-1 (THBS1), фактор фон Виллебранда (VWF), ингибитор активатора плазминогена (SERPINE1), мультимерин-1 (MMRN1); 2) молекулярные шапероны: кальретикулин (CALR), белки теплового шока (HSP90AA1, HSP90B1, HSP47/SERPINH1), кластерин (CLU); 3) матрикс-деградирующие ферменты: катепсин В (CTSB), катепсин С (CTSC), катепсин D (CTSD), катепсин Z (CTSZ), матриксная металлопротеиназа 2 (MMP2); 4) ингибиторы матрикс-деградирующих ферментов: (TIMP1 и TIMP2), серпины (SERPINB1, SERPINB6, SERPINB8, SERPINB9), цистатин В (CSTB); 5) плейотропные матриклеточные белки: галектин-1 (LGALS1), галектин-3 (LGALS3), бигликан (BGN), соединительнотканый фактор роста (CCN2/CTGF), CCN1, SPOCK1, TINAGL1, EFEMP1, IGFBP7; 6) сшивающие молекулы (TGM2, PLOD1, PLOD3) (рис. 7). Из синтезируемых, но не выделяемых в значительных количествах молекул можно отметить кальций-связывающие (ANXA4,

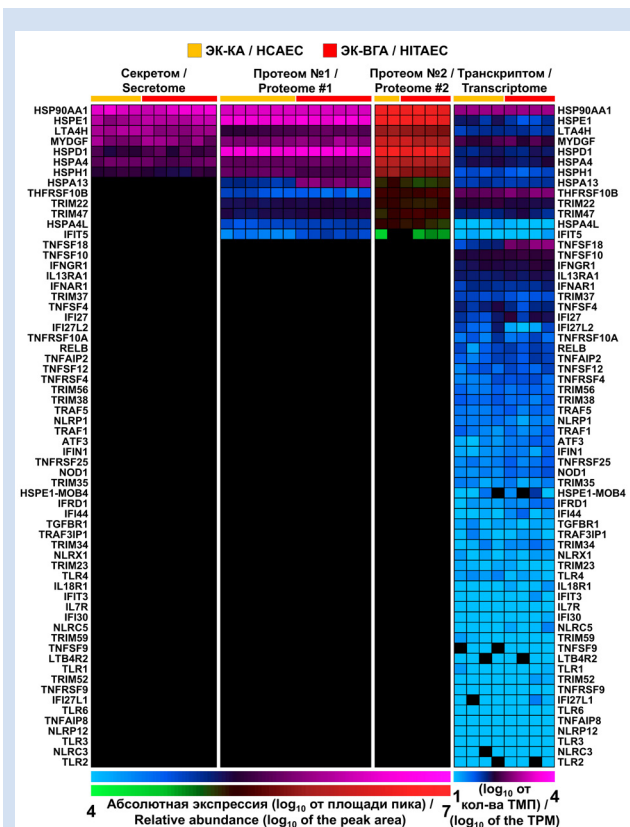


Рисунок 5. Тепловая карта, демонстрирующая экспрессию белков внутриклеточных провоспалительных сигнальных каскадов в секретоме (культуральной среде), во внутриклеточном протеоме и в транскриптоме ЭК-КА и ЭК-ВГА, культивированных в бессывороточной культуральной среде EndoLife в течение 24 часов. Протеом № 1 и протеом № 2 представляют собой массивы данных из разных экспериментов, проведенных в разное время

Figure 5. Heat map demonstrating the expression of intracellular pro-inflammatory proteins in secretome (cell culture supernatant), intracellular proteome, and transcriptome of human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) cultured in serum-free medium for 24 hours. Proteome #1 and proteome #2 represent datasets from different experiments conducted in distinct time periods

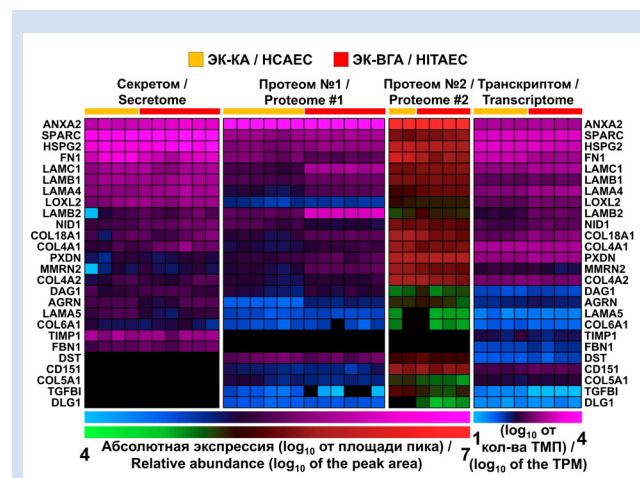


Рисунок 6. Тепловая карта, демонстрирующая экспрессию белков эндотелиальной базальной мембраны в секретоме (культуральной среде), во внутриклеточном протеоме и в транскриптоме ЭК-КА и ЭК-ВГА, культивированных в бессывороточной культуральной среде EndoLife в течение 24 часов. Протеом № 1 и протеом № 2 представляют собой массивы данных из разных экспериментов, проведенных в разное время

Figure 6. Heat map demonstrating the expression of endothelial basement membrane proteins in secretome (cell culture supernatant), intracellular proteome, and transcriptome of human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) cultured in serum-free medium for 24 hours. Proteome #1 and proteome #2 represent datasets from different experiments conducted in distinct time periods

ANXA7, ANXA11, MGP, рис. 7). Также следует отметить высокую активность синтеза и выделения компонентов субэндотелиального внеклеточного матрикса на белковом уровне на фоне относительно умеренной транскрипции большинства из них (рис. 7). По аналогии с эндотелиальной базальной мембраной, среди белков субэндотелиального внеклеточного матрикса отмечалась высокая доля выделяемых белков от всех синтезируемых (рис. 7).

Полученные данные свидетельствовали о важной роли ЭК в формировании и динамическом регулировании качественного и количественного со-

става субэндотелиального внеклеточного матрикса, а не только эндотелиальной базальной мембраны. Физиологическим объяснением этого, как и в случае с белками эндотелиальной базальной мембраны, может служить несущественное присутствие иных клеточных популяций в районе субэндотелиального внеклеточного матрикса (за исключением небольшого количества резидентных макрофагов и фибробластов). В совокупности активный синтез ЭК компонентов эндотелиальной базальной мембраны и субэндотелиального внеклеточного матрикса свидетельствует о важности секреторной роли ЭК внутри сосудистой стенки (при формировании интимы), а не только в контексте молекул, выделяемых ими в системный кровоток.

Все активно выделяемые ангиогенные молекулы (большая часть из которых относилась к маркерам эндотелиального фенотипа, эндотелиальной базальной мембраны и субэндотелиального внеклеточного матрикса) также характеризовались высокой экспрессией на уровне белка и на геномном уровне (рис. 8). Всего в культуральной среде от ЭК детектировали около 50 ангиогенных молекул, большинство из которых обладало плеiotропными функциями (рис. 8). Наиболее выделяемыми ангиогенными молекулами были: 1) структурные белки цитоскелета, перестройки которых способствуют миграции ЭК: гамма-актин (ACTG1), филамин А (FLNA), одна из тяжелых цепей миозина (MYH9) и кальдесмон (CALD1); 2) маркеры эндотелиального фенотипа (MCAM/CD146, BSG/CD147, NRP1, NRP2, TIE1, ESM); 3) субъединицы интегринов (ITGB1 и ITGA5); 4) регуляторы синтеза белка на рибосомах: нуклеолин (NCL), взаимодействующий с аминоксил-тРНК-синтетазой многофункциональный белок (AIMP1) и триптофанил-тРНК-синтетаза 1 (WARS1); 5) белки эндотелиальной базальной мембраны: перлекан (HSPG2), субъединицы коллагена (COL4A2, COL18A1) и фибронектин (FN1); 6) матриксные металлопротеиназы (MMP2, MMP14), и фактор роста соединительной ткани (CCN2/CTGF); 7) прочие белки различных молекулярных категорий: кальций-связывающий мембранный белок аннексин А2 (ANXA2), YWHAZ (14-3-3ζ) и аланиламинопептидаза (аминопептидаза N, ANPEP), ингибитор активатора плазминогена (SERPINE1), белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста (IGFBP7), регулятор эндоцитоза кавеолин-1 (CAV1), белок внутриклеточных каналов хлора (CLIC4), миелоидный фактор роста (MYDGF) и субъединица комплекса АТФ-синтазы (ATP5F1B) (рис. 8). Это позволяет предположить, что ангиогенез в значительной степени опосредован не специфическими ангиогенными молекулами (ANGPT2, ANGPTL2 и другими), а белками с плеiotропным действием, в том числе относящимся к другим функциональным группам (рис. 8). Однако

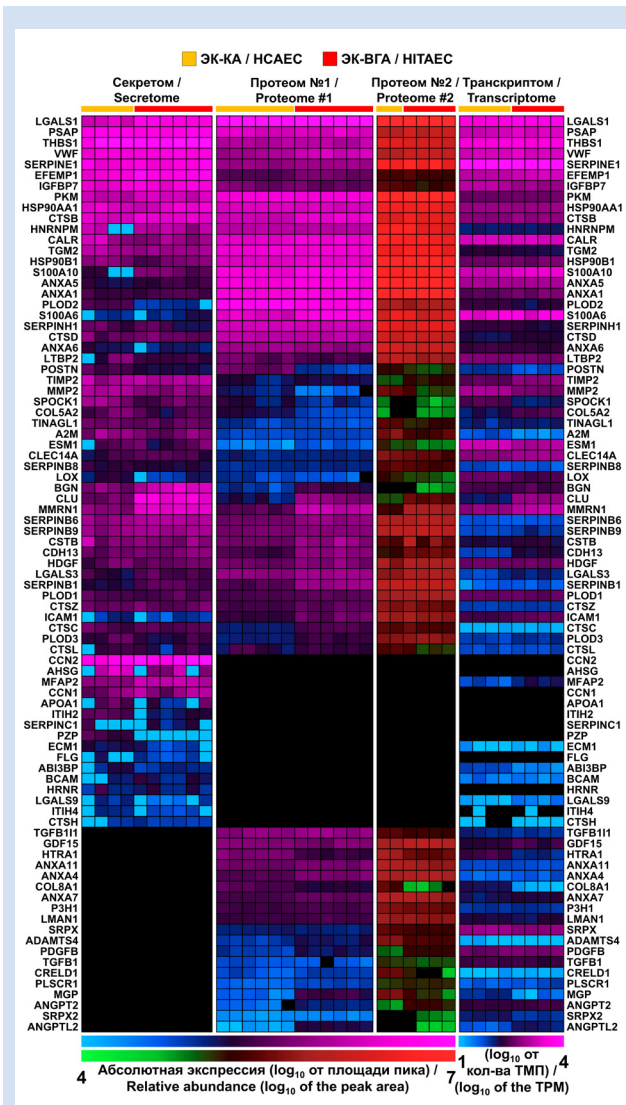


Рисунок 7. Тепловая карта, демонстрирующая экспрессию белков субэндотелиального внеклеточного матрикса в секрете (культуральной среде), во внутриклеточном протеоме и в транскриптоме ЭК-КА и ЭК-ВГА, культивированных в бессывороточной культуральной среде EndoLife в течение 24 часов. Протеом № 1 и протеом № 2 представляют собой массивы данных из разных экспериментов, проведенных в разное время

Figure 7. Heat map demonstrating the expression of sub-endothelial extracellular matrix proteins in secretome (cell culture supernatant), intracellular proteome, and transcriptome of human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) cultured in serum-free medium for 24 hours. Proteome #1 and proteome #2 represent datasets from different experiments conducted in distinct time periods

центральное значение ЭК для ангиогенеза обуславливает многообразие выделяемых ими ангиогенных молекул (рис. 8).

Анализ белков гемостаза выявил значительное их количество (около 65) в секрете ЭК и синтез около 100 из них на генном и белковом уровне (рис. 9). Практически все выделяемые ЭК белки гемостаза характеризовались высокой интенсивностью транскрипции и трансляции (рис. 9). Данная функциональная группа также пересекалась с прочими, поскольку в нее входили: 1) белки эндотелиальной базальной мембраны: остеоонектин (SPARC) и фибронектин (FN1); 2) компоненты субэндотелиального внеклеточного матрикса: тромбоспондин-1

(THBS1), ингибитор активатора плазминогена (SERPINE1), мультимерин-1 (MMRN1), тканевой ингибитор металлопротеиназы-1 (TIMP1) и кластерин (CLU): 3) ангиогенные молекулы (ACTG1,

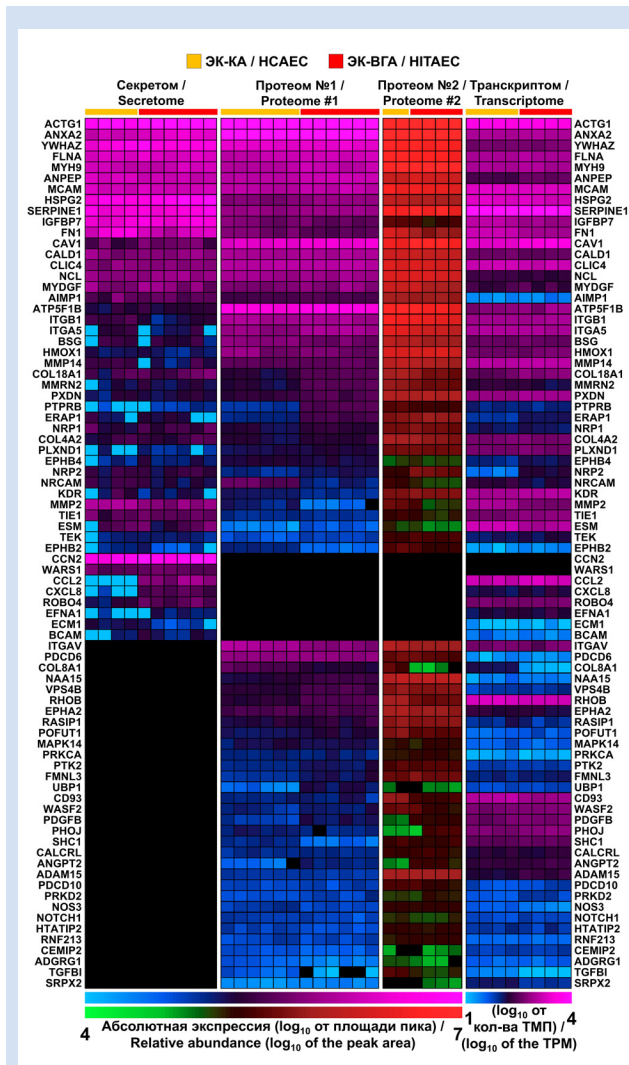


Рисунок 8. Тепловая карта, демонстрирующая экспрессию белков сигнальных путей ангиогенеза в секрете (культуральной среде), во внутриклеточном протеоме и в транскриптоме ЭК-КА и ЭК-ВГА, культивированных в бессывороточной культуральной среде EndoLife в течение 24 часов. Протеом № 1 и протеом № 2 представляют собой массивы данных из разных экспериментов, проведенных в разное время

Figure 8. Heat map demonstrating the expression of angiogenic proteins in secretome (cell culture supernatant), intracellular proteome, and transcriptome of human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) cultured in serum-free medium for 24 hours. Proteome #1 and proteome #2 represent datasets from different experiments conducted in distinct time periods

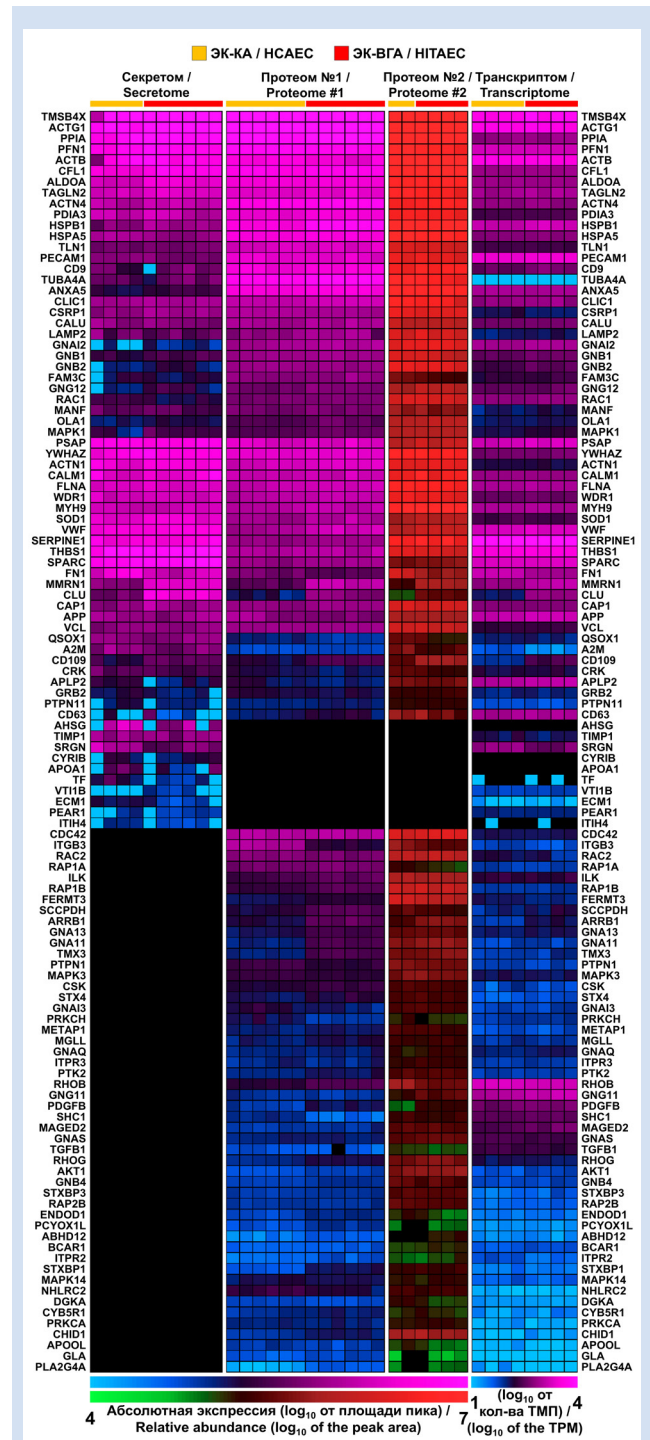


Рисунок 9. Тепловая карта, демонстрирующая экспрессию белков сигнальных путей гемостаза в секрете (культуральной среде), во внутриклеточном протеоме и в транскриптоме ЭК-КА и ЭК-ВГА, культивированных в бессывороточной культуральной среде EndoLife в течение 24 часов. Протеом № 1 и протеом № 2 представляют собой массивы данных из разных экспериментов, проведенных в разное время

Figure 9. Heat map demonstrating the expression of hemostasis proteins in secretome (cell culture supernatant), intracellular proteome, and transcriptome of human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) cultured in serum-free medium for 24 hours. Proteome #1 and proteome #2 represent datasets from different experiments conducted in distinct time periods

FLNA, MYH9, VCL, рис. 9). Следует отметить большое количество белков цитоскелета и ассоциированных с ними молекул в культуральной среде от ЭК: тимозин β 4, (TMSB4X), гамма-актин (ACTG1), профилин-1 (PFN1), бета-актин (ACTB), кофилин-1 (CFL1), трансгелин-2 (TAGLN2), альфа-актинины (ACTN1 и ACTN4), талин-1 (TLN1), тубулин-альфа (TUBA4A), филамин-А (FLNA), взаимодействующий с актином белок WDR1, одна из тяжелых цепей миозина (MYH9) и циклаза-ассоциированный белок (CAP1), а также некоторое количество шаперонов (PDIA3, HSPB1, HSPA5) и кальций-связывающих белков: аннексин А5 (ANXA5), калуменин (CALU), кальмодулин (CALM1) и фетуин-А (AHSG, рис. 9). Как и в случае с белками эндотелиальной базальной мембраны и субэндотелиального внеклеточного матрикса, доля выделяемых ЭК ангиогенных молекул от синтезируемых была достаточно высокой (более 50%), что отражало важность ЭК для поддержания гемостаза (рис. 9). Пересечение значительной доли молекул между компонентами внеклеточного матрикса, ангиогенеза и гемостаза указывает на взаимосвязь этих процессов в контексте физиологии эндотелия. Базальный синтез ряда белков теплового шока (HSP90AA1, HSPA4, HSPA4L, HSPA13, HSPD1, HSPE1 и HSPH1) позволяет предположить определенный уровень метаболического стресса, неизбежно возникающего при активных синтетических процессах в ЭК.

Несмотря на важность метаболизма монооксида азота (NO) для регуляции тонуса сосудов, количество соответствующих молекул, выделяемых и синтезируемых ЭК, является сравнительно небольшим (около 15 во внутриклеточном протеоме и лишь 6 в секрете, рис. 10). При этом наиболее экспрессируемые молекулы – кальмодулин (CALM1), белок теплового шока (HSP90AA1) и кавеолин-1 (CAV1) – активно транскрибировались и транслировались в ЭК (рис. 10). Из прочих активно транслируемые белки (DDAH1, LYPLA1, NMT1 и CYB5B) три первых также детектировались в культуральной среде, однако для оценки активности сигнального пути биосинтеза NO приоритетна в первую очередь оценка экспрессии данных белков во внутриклеточном протеоме (рис. 10). Сам по себе ген NOS3, как и соответствующий ингибирующий белок NOSIP, характеризовался относительно устойчивой экспрессией в транскриптоме и протеоме, однако она была достаточно низкой даже на фоне прочих молекул сигнального пути NO (рис. 10). Дальнейший анализ сигнальных путей эндотелий-зависимой вазореактивности потребовало изучения молекулярных категорий вазодилатации (GO:0042311) и вазоконстрикции (GO:0042310).

При более широком анализе содержащихся в ЭК белков вазодилатационных сигнальных путей было выявлено 41 транскрибируемых гена и лишь 8 син-

тезируемых белков, 5 из которых детектировались в секрете ЭК, (рис. 11).

Аналогичная картина наблюдалась и при ана-

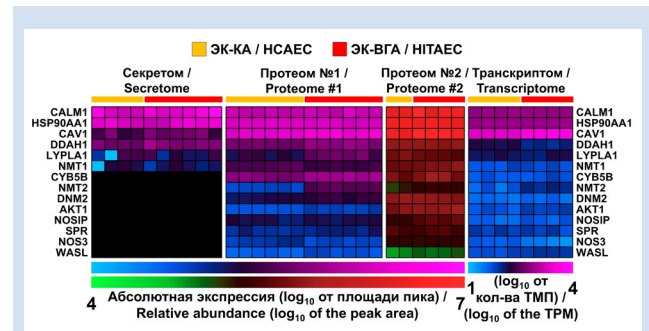


Рисунок 10. Тепловая карта, демонстрирующая экспрессию белков сигнальных путей метаболизма NO в секрете (культуральной среде), во внутриклеточном протеоме и в транскриптоме ЭК-КА и ЭК-ВГА, культивированных в бессывороточной культуральной среде EndoLife в течение 24 часов. Протеом № 1 и протеом № 2 представляют собой массивы данных из разных экспериментов, проведенных в разное время

Figure 10. Heat map demonstrating the expression of nitric oxide metabolism proteins in secretome (cell culture supernatant), intracellular proteome, and transcriptome of human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) cultured in serum-free medium for 24 hours. Proteome #1 and proteome #2 represent datasets from different experiments conducted in distinct time periods

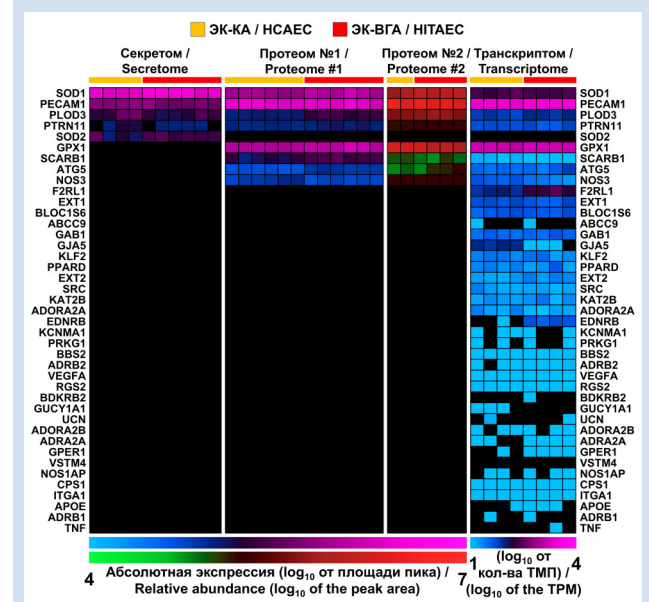


Рисунок 11. Тепловая карта, демонстрирующая экспрессию белков сигнальных путей вазодилатации в секрете (культуральной среде), во внутриклеточном протеоме и в транскриптоме ЭК-КА и ЭК-ВГА, культивированных в бессывороточной культуральной среде EndoLife в течение 24 часов. Протеом № 1 и протеом № 2 представляют собой массивы данных из разных экспериментов, проведенных в разное время

Figure 11. Heat map demonstrating the expression of vasodilation proteins in secretome (cell culture supernatant), intracellular proteome, and transcriptome of human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) cultured in serum-free medium for 24 hours. Proteome #1 and proteome #2 represent datasets from different experiments conducted in distinct time periods

лизе вазоконстрикционных сигнальных путей, хотя в целом вазоконстрикционная активность ЭК была ниже вазодилатационной (20 транскрибируемых генов, 5 синтезируемых белков и 4 белка, выделяемых в микроокружение, рис. 12). Полученные результаты указывают на более активное участие интактных ЭК-КА и ЭК-ВГА в вазодилатации в сравнении с вазоконстрикцией.

Обсуждение

Расшифровка молекулярного фенотипа ЭК при помощи высокопроизводительных методов является обязательной предпосылкой для последующего сравнения различий между интактными и дисфункциональными ЭК, а также для выявления процессов, отличающих стареющие ЭК в процессе их длительного пассажирования [19, 20]. Ранее было показано, что дисфункциональные [12–15] и стареющие [19, 20] ЭК отличаются провоспалительной активацией, отражаемой повышенной экспрессией молекул клеточной адгезии и увеличенным выделением широкого спектра провоспалительных цитокинов (в совокупности классифицируемых как ассоциированный со старением секреторный фенотип [21–23]). Данные патологические процессы становятся особенно заметными при воздействии иных патологических факторов, к примеру, при гипергликемии и воздействии окисленных липопротеинов низкой плотности на модели АроЕ-нокаутных мышей [24]. Данное мультиомиксное исследование подразумевало сочетание полнотранскриптомного секвенирования и хромато-масс-спектрометрического исследования внутриклеточного протеома и секретома ЭК-КА и ЭК-ВГА, обладающих лишь

ограниченной молекулярной гетерогенностью и в совокупности отражающих эндотелий атерочувствительных и атерорезистентных артерий. Биоинформатический анализ включал в себя мануальное (по данным анализа литературы) или автоматическое (по аннотациям биоинформатических баз данных) выделение релевантных для физиологии эндотелия молекулярных категорий: маркеров эндотелиального фенотипа, прочих белков межэндотелиальных контактов (плотных, адгезивных и щелевых) и контактов ЭК с базальной мембраной (интегринов), молекул клеточной адгезии, провоспалительных цитокинов, белков внутриклеточных провоспалительных сигнальных каскадов, белков эндотелиальной базальной мембраны и субэндотелиального внеклеточного матрикса, белков сигнальных путей ангиогенеза и гемостаза, а также белков сигнальных путей вазодилатации и вазоконстрикции.

Проведенное исследование показало, что маркерами эндотелиального фенотипа с наиболее высоким уровнем содержания в секретоме и внутриклеточном протеоме интактных ЭК-КА и ЭК-ВГА являются фактор фон Виллебранда (vWF), EPCR/CD201, MCAM/CD146, ICAM2/CD102, VE-кадгерин/CDH5/CD144 и PECAM1/CD31. При этом большинство маркеров эндотелиального фенотипа (около 30 из 45) выделялись в микроокружение ЭК даже в интактном состоянии. Артериальные ЭК характеризовались устойчивой экспрессией генов транскрипционных факторов пан-эндотелиальной дифференцировки ERG и FLI1 и кодируемых ими белков (в особенности первого из них), а также гена и белка NOS3 (эндотелиальной NO-синтазы). Большинство эндотелиальных молекул клеточной адгезии в интактных ЭК-КА и ЭК-ВГА обладали низкой базальной экспрессией и являлись индуцибельными (ICAM1, NRCAM, ALCAM, SELE, VCAM1), за исключением конститутивно экспрессируемых MCAM/CD146, ICAM2/CD102 и PECAM1/CD31. Хотя артериальные ЭК экспрессировали около 40 генов цитокинов, лишь около 10 из них синтезировались в относительно значимых количествах (включая MIF, PTX3, CSF1, CCL2, CCL14, IL-8/CXCL8 и CXCL1). Это, с одной стороны, позволяет предположить относительно низкую базальную провоспалительную активность ЭК, а с другой – требует учитывать их в качестве скрытого резервуара развития системного воспаления вследствие многообразия экспрессируемых генов потенциально индуцибельных цитокинов. В пользу данной гипотезы свидетельствует и малое количество синтезируемых и выделяемых белков внутриклеточных провоспалительных сигнальных каскадов. Содержание цитокинов в культуральной среде существенно превышало таковое в лизате ЭК, что указывает на высокую скорость их выде-

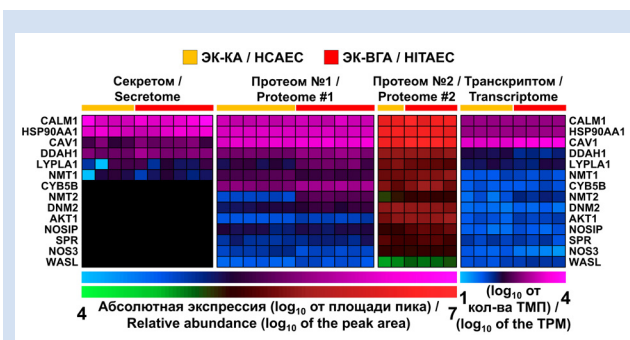


Рисунок 12. Тепловая карта, демонстрирующая экспрессию белков сигнальных путей вазоконстрикции в секретоме (культуральной среде), во внутриклеточном протеоме и в транскриптоме ЭК-КА и ЭК-ВГА, культивированных в бессывороточной культуральной среде EndoLife в течение 24 часов. Протеом № 1 и протеом № 2 представляют собой массивы данных из разных экспериментов, проведенных в разное время

Figure 12. Heat map demonstrating the expression of vasoconstriction proteins in secretome (cell culture supernatant), intracellular proteome, and transcriptome of human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) cultured in serum-free medium for 24 hours. Proteome #1 and proteome #2 represent datasets from different experiments conducted in distinct time periods

ления в микроокружение и системный кровоток после синтеза.

В соответствии с жизненно важной ролью эндотелиальной базальной мембраны ЭК характеризовались высокой экспрессией и выделением практически всех ее компонентов (около 20), а также значительного количества компонентов субэндотелиального внеклеточного матрикса (около 65). Высокая доля выделяемых белков эндотелиальной базальной мембраны и субэндотелиального внеклеточного матрикса от синтезируемых подтверждает принципиальную важность ЭК для формирования и динамической регуляции их качественного и количественного состава и указывает на высокий синтетический потенциал ЭК в контексте тканевой инженерии. Кроме того, полученные результаты указывают на значимость секреторной роли ЭК внутри сосудистой стенки, а не только в контексте молекул, выделяемых ими в системный кровоток. В культуральной среде от ЭК детектировали также около 50 ангиогенных и около 65 гемостатических молекул, большинство из которых обладало плейотропными функциями. Многообразие выделяемых ЭК ангиогенных и гемостатических молекул подтверждает их центральную роль в указанных процессах. Пересечение значительной доли молекул между компонентами внеклеточного матрикса, ангиогенеза и гемостаза указывает на взаимосвязь этих процессов в контексте физиологии эндотелия. Базальный синтез ряда белков теплового шока позволяет предположить определенный уровень метаболического стресса, неизбежно возникающего при активных синтетических процессах в ЭК.

Несмотря на важность метаболизма NO для регуляции тонуса сосудов, количество молекул данного сигнального пути, выделяемых и синтезируемых ЭК, являлось сравнительно небольшим, что указывает на менее выраженную иерархичность белковой регуляции вазоактивности ЭК в сравнении с ангиогенной и гемостатической функциями. Большое количество транскрибируемых генов и синтезируемых белков вазодилатационных сигнальных путей в сравнении с вазоконстрикционными указывают на более активное участие интактных ЭК в вазодилатации в сравнении с вазоконстрикцией. При анализе всех указанных функциональных классов отмечалось принципиальное соответствие экспрессии большинства молекул на уровне транскриптома, протеома и секретома (то есть практически все выделяемые ЭК белки характеризовались высокой интенсивностью трансляции и транскрипции соответствующих генов), проанализированных в трех независимых экспериментах, что указывает на техническую валидность полученных результатов.

Следует отметить, что в данной статье не ставилась задача сравнительного анализа между различными группами, ее целью был именно анализ

иерархии генной и белковой экспрессии в интактных ЭК – не как сравнительный, а как описательный феномен. Поскольку анализ различий базальной экспрессии генов и белков в ЭК коронарной и внутренней грудной артерии был выполнен ранее [26, 27], в данной статье мы не проводили подобного сравнения (частично оно тем не менее возможно вследствие визуализации по тепловым картам, на которых представлен каждый из исследованных образцов). В то же время принципиальных различий, ограничивающих совместный анализ состояния ЭК двух данных артерий для генерализации выводов на первичные ЭК артерий, нами выявлено не было.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о высокой базальной биоактивности ЭК в контексте поддержания ими ангиогенеза, гемостаза, синтеза компонентов эндотелиальной базальной мембраны и субэндотелиального внеклеточного матрикса, а также о низкой базальной провоспалительной активности ЭК в сочетании с высоким потенциалом их патологической активации при воздействии соответствующих стимулов. Данные результаты предоставляют фундаментальную основу для проведения доклинических исследований эндотелиопротективных, антиатеросклеротических и сенолитических фармакологических вмешательств на первичных культурах ЭК человека и на гиперлипидемических (в том числе ApoE^{-/-}) мышах.

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. Е.С. Изотова заявляет об отсутствии конфликта интересов. Ю.О. Юрьева заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.И. Лазебная заявляет об отсутствии конфликта интересов. Е.А. Репкин заявляет об отсутствии конфликта интересов. М.Р. Кабилов заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Е. Тупикин заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Г. Кутихин заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2024-0001 «Разработка новых фармакологических подходов к экспериментальной терапии атеросклероза, технологий серийного производства реактивов и расходных материалов для изучения физиологии и патофизиологии сердеч-

но-сосудистой системы и программного обеспечения на основе искусственного интеллекта для автоматизированной диагностики патологий системы кровообращения и автоматизированного расчета сердечно-сосудистого риска» при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках национального проекта «Наука и университеты», <https://gisnauka.ru/nioktr/detail/5O90V6DKTDEZ3L37R544GP18>.

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

Изотова Елизавета Сергеевна, аспирант федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0009-0008-8676-1789

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

Репкин Егор Алексеевич, специалист ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий»

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., 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., 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., PhD, MD, 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

Izotova Elizaveta S., PhD Student, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0009-0008-8676-1789

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

Repkin Egor A., Specialist, Resource Centre Development of Molecular and Cellular Technologies, Research Park,

научного парка федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (СПбГУ), Санкт-Петербург, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-8599-3173

Кабилев Марсель Расимович, руководитель центра коллективного пользования «Геномика» федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН), 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 (ИХБФМ СО РАН), Новосибирск, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-8194-0322

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

Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-8599-3173

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

Kutikhin Anton G., PhD, MD, 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

Вклад авторов в статью

MVE – 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, 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, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

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

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

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

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

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

Author Contribution Statement

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

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

SAD – contribution to the concept and design of the study, data acquisition, 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, approval of the final version, fully responsible for the content

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

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

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

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

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

ТАЕ – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение и интерпретация данных исследования, 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

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

КАГ – 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

1. 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.
2. Becker LM, Chen SH, Rodor J, de Rooij LPMH, Baker AH, Carmeliet P. Deciphering endothelial heterogeneity in health and disease at single-cell resolution: progress and perspectives. *Cardiovasc Res.* 2023;119(1):6-27. doi: 10.1093/cvr/cvac018.
3. Gomez-Salinerо JM, Redmond D, Rafii S. Microenvironmental determinants of endothelial cell heterogeneity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2025;26(6):476-495. doi: 10.1038/s41580-024-00825-w.
4. Gao Y, Galis ZS. Exploring the Role of Endothelial Cell Resilience in Cardiovascular Health and Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(1):179-185. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314346.
5. Rafii S, Butler JM, Ding BS. Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. *Nature.* 2016;529(7586):316-25. doi: 10.1038/nature17040.
6. Greenspan LJ, Weinstein BM. To be or not to be: endothelial cell plasticity in development, repair, and disease. *Angiogenesis.* 2021;24(2):251-269. doi: 10.1007/s10456-020-09761-7.
7. Gifre-Renom L, Daems M, Luttun A, Jones EAV. Organ-Specific Endothelial Cell Differentiation and Impact of Microenvironmental Cues on Endothelial Heterogeneity. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1477. doi: 10.3390/ijms23031477.
8. Kraler S, Libby P, Evans PC, Akhmedov A, Schmiady MO, Reinehr M, Camici GG, Lüscher TF. Resilience of the Internal Mammary Artery to Atherogenesis: Shifting From Risk to Resistance to Address Unmet Needs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(8):2237-2251. doi: 10.1161/ATVBAHA.121.316256.
9. 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.
10. Shishkova D, Markova V, Sinitsky M, Tsepokina A, Frolov A, Zagorodnikov N, Bogdanov L, Kutikhin A. Co-Culture of Primary Human Coronary Artery and Internal Thoracic Artery Endothelial Cells Results in Mutually Beneficial Paracrine Interactions. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):8032. doi: 10.3390/ijms21218032.
11. Фролов А.В., Шишкова Д.К., Маркова В.Е., Синицкий М.Ю., Синицкая А.В., Поддубняк А.О., Канонькина А.Ю., Загородников Н.И., Григорьев Е.В., Кутихин А.Г. Оценка паракринных эффектов кондиционированной среды в ходе ее перекрестного добавления при моделировании взаимодействий в морфофункциональной системе “конduit–артерия”. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* 2022. Т. 108. № 8. С. 940-956. doi: 10.31857/S0869813922080039.
12. 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.
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. Cho ME, Brunt VE, Shiu YT, Bunsawat K. Endothelial dysfunction in chronic kidney disease: a clinical perspective. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2025;329(1):H135-H153. doi: 10.1152/ajpheart.00908.2024.
15. 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.
16. Najari Beidokhti M, Villalba N, Ma Y, Reynolds A, Villamil JH, Yuan SY. Lung endothelial cell senescence impairs barrier function and promotes neutrophil adhesion and migration. *Geroscience.* 2025;47(3):2655-2671. doi: 10.1007/s11357-025-01517-9.
17. Novo JP, Gee L, Caetano CA, Tomé I, Vilaça A, von Zglinicki T, Moreira IS, Jurk D, Rosa S, Ferreira L. Blood-brain barrier dysfunction in aging is mediated by brain endothelial senescence. *Aging Cell.* 2024;23(9):e14270. doi: 10.1111/ace1.14270.
18. Ungvari Z, Tarantini S, Kiss T, Wren JD, Giles CB, Griffin CT, Murfee WL, Pachter P, Csiszar A. Endothelial dysfunction and angiogenesis impairment in the ageing vasculature. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(9):555-565. doi: 10.1038/s41569-018-0030-z.
19. Bloom SI, Islam MT, Lesniewski LA, Donato AJ. Mechanisms and consequences of endothelial cell senescence. *Nat Rev Cardiol.* 2023;20(1):38-51. doi: 10.1038/s41569-022-00739-0.
20. Han Y, Kim SY. Endothelial senescence in vascular diseases: current understanding and future opportunities in senotherapeutics. *Exp Mol Med.* 2023;55(1):1-12. doi: 10.1038/s12276-022-00906-w.
21. Wang B, Han J, Elisseff JH, Demaria M. The senescence-associated secretory phenotype and its physiological and pathological implications. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2024;25(12):958-978. doi: 10.1038/s41580-024-00727-x.
22. Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021;22(2):75-95. doi: 10.1038/s41580-020-00314-w.
23. Mehdizadeh M, Aguilar M, Thorin E, Ferbeyre G, Nattel S. The role of cellular senescence in cardiac disease: basic biology and clinical relevance. *Nat Rev Cardiol.* 2022;19(4):250-264. doi: 10.1038/s41569-021-00624-2.
24. Fatima S, Ambreen S, Mathew A, Elwakiel A, Gupta A, Singh K, Krishnan S, Rana R, Khawaja H, Gupta D, Manoharan J, Besler C, Laufs U, Kohli S, Isermann B, Shahzad K. ER-Stress and Senescence Coordinately Promote Endothelial Barrier Dysfunction in Diabetes-Induced Atherosclerosis. *Nutrients.* 2022;14(14):2786. doi: 10.3390/nu14142786.
25. Шишкова Д.К., Фролов А.В., Маркова В.Е., Маркова Ю.О., Лазебная А.И., Кутихин А.Г. Актуальные проблемы методологии изучения нормальной и патологической физиологии эндотелиальных клеток в культуре. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2024. Т. 13. № 3. С. 118-129. doi: 10.17802/2306-1278-2024-13-3-118-129.
26. 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.
27. 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.

REFERENCES

1. 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.
2. Becker LM, Chen SH, Rodor J, de Rooij LPMH, Baker AH, Carmeliet P. Deciphering endothelial heterogeneity in health and disease at single-cell resolution: progress and perspectives. *Cardiovasc Res.* 2023;119(1):6-27. doi: 10.1093/cvr/cvac018.
3. Gomez-Salinerio JM, Redmond D, Rafii S. Microenvironmental determinants of endothelial cell heterogeneity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2025;26(6):476-495. doi: 10.1038/s41580-024-00825-w.
4. Gao Y, Galis ZS. Exploring the Role of Endothelial Cell Resilience in Cardiovascular Health and Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(1):179-185. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314346.
5. Rafii S, Butler JM, Ding BS. Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. *Nature.* 2016;529(7586):316-25. doi: 10.1038/nature17040.
6. Greenspan LJ, Weinstein BM. To be or not to be: endothelial cell plasticity in development, repair, and disease. *Angiogenesis.* 2021;24(2):251-269. doi: 10.1007/s10456-020-09761-7.
7. Gifre-Renom L, Daems M, Luttun A, Jones EAV. Organ-Specific Endothelial Cell Differentiation and Impact of Microenvironmental Cues on Endothelial Heterogeneity. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1477. doi: 10.3390/ijms23031477.
8. Kraler S, Libby P, Evans PC, Akhmedov A, Schmiady MO, Reinehr M, Camici GG, Lüscher TF. Resilience of the Internal Mammary Artery to Atherogenesis: Shifting From Risk to Resistance to Address Unmet Needs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021;41(8):2237-2251. doi: 10.1161/ATVBAHA.121.316256.
9. 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.
10. Shishkova D, Markova V, Sinitsky M, Tsepokina A, Frolov A, Zagorodnikov N, Bogdanov L, Kutikhin A. Co-Culture of Primary Human Coronary Artery and Internal Thoracic Artery Endothelial Cells Results in Mutually Beneficial Paracrine Interactions. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):8032. doi: 10.3390/ijms21218032.
11. Frolov A.V., Shishkova D.K., Markova V.E., Sinitsky M.Yu., Sinitskaya A.V., Poddubnyak A.O., Kanonykina A.Yu., Zagorodnikov N.I., Grigoriev E.V., Kutikhin A.G. Paracrine effects of conditioned medium during its cross-addition to arterial and venous endothelial cells. *Russian Journal of Physiology.* 2022. Vol. 108. № 8. P. 940-956. doi: 10.31857/S0869813922080039.
12. 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.
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. Cho ME, Brunt VE, Shiu YT, Bunsawat K. Endothelial dysfunction in chronic kidney disease: a clinical perspective. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2025;329(1):H135-H153. doi: 10.1152/ajpheart.00908.2024.
15. 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.
16. Najari Beidokhti M, Villalba N, Ma Y, Reynolds A, Villamil JH, Yuan SY. Lung endothelial cell senescence impairs barrier function and promotes neutrophil adhesion and migration. *Geroscience.* 2025;47(3):2655-2671. doi: 10.1007/s11357-025-01517-9.
17. Novo JP, Gee L, Caetano CA, Tomé I, Vilaça A, von Zglinicki T, Moreira IS, Jurk D, Rosa S, Ferreira L. Blood-brain barrier dysfunction in aging is mediated by brain endothelial senescence. *Aging Cell.* 2024;23(9):e14270. doi: 10.1111/accel.14270.
18. Ungvari Z, Tarantini S, Kiss T, Wren JD, Giles CB, Griffin CT, Murfee WL, Pacher P, Csiszar A. Endothelial dysfunction and angiogenesis impairment in the ageing vasculature. *Nat Rev Cardiol.* 2018;15(9):555-565. doi: 10.1038/s41569-018-0030-z.
19. Bloom SI, Islam MT, Lesniewski LA, Donato AJ. Mechanisms and consequences of endothelial cell senescence. *Nat Rev Cardiol.* 2023;20(1):38-51. doi: 10.1038/s41569-022-00739-0.
20. Han Y, Kim SY. Endothelial senescence in vascular diseases: current understanding and future opportunities in senotherapeutics. *Exp Mol Med.* 2023;55(1):1-12. doi: 10.1038/s12276-022-00906-w.
21. Wang B, Han J, Elisseeff JH, Demaria M. The senescence-associated secretory phenotype and its physiological and pathological implications. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2024;25(12):958-978. doi: 10.1038/s41580-024-00727-x.
22. Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021;22(2):75-95. doi: 10.1038/s41580-020-00314-w.
23. Mehdizadeh M, Aguilar M, Thorin E, Ferbeyre G, Nattel S. The role of cellular senescence in cardiac disease: basic biology and clinical relevance. *Nat Rev Cardiol.* 2022;19(4):250-264. doi: 10.1038/s41569-021-00624-2.
24. Fatima S, Ambreen S, Mathew A, Elwakiel A, Gupta A, Singh K, Krishnan S, Rana R, Khawaja H, Gupta D, Manoharan J, Besler C, Laufs U, Kohli S, Isermann B, Shahzad K. ER-Stress and Senescence Coordinately Promote Endothelial Barrier Dysfunction in Diabetes-Induced Atherosclerosis. *Nutrients.* 2022;14(14):2786. doi: 10.3390/nu14142786.
25. Shishkova D.K., Frolov A.V., Markova V.E., Markova Y.O., Lazebnaya A.I., Kutikhin A.G. Improving methodology of endothelial cell research: synopsis and prospects. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases = Kompleksnye problemy serdечно-sosudistykh zabolevanij.* 2024. Vol. 13. № 3. P. 118-129. doi: 10.17802/2306-1278-2024-13-3-118-129.
26. 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.
27. Stepanov A, Shishkova D, Markova V, Markova Y, Frolov A, Lazebnaya A, Oshchepkova K, Pereletchikova 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.

Для цитирования: Маркова В.Е., Шшишкова Д.К., Степанов А.Д., Фролов А.В., Изотова Е.С., Юрьева Ю.О., Лазебная А.И., Репкин Е.А., Кабилов М.Р., Тупикин А.Е., Кутихин А.Г. Биоинформатический анализ функционирования первичных артериальных эндотелиальных клеток в физиологическом состоянии на основании мультиомиксных данных. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2026;15(2): 187-205. DOI: 10.17802/2306-1278-2026-15-2-187-205

To cite: Markova V.E., Shishkova D.K., Stepanov A.D., Frolov A.V., Izotova E.S., Yurieva Yu.O., Lazebnaya A.I., Repkin E.A., Kabilov M.R., Tupikin A.E., Kutikhin A.G. *Bioinformatic, multi-omics analysis of intact arterial endothelial cells. Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2026;15(2): 187-205. DOI: 10.17802/2306-1278-2026-15-2-187-205