



УДК 577.21: 611.018.74:576.535.2

DOI 10.17802/2306-1278-2020-9-2-74-81

## СРАВНЕНИЕ ПРОФИЛЯ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ КОЛОНИЕФОРМИРУЮЩИХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОРОНАРНОЙ АРТЕРИИ

Е.А. Великанова<sup>1</sup> ✉, А.Г. Кутихин<sup>1</sup>, В.Г. Матвеева<sup>1</sup>, А.Е. Тупикин<sup>2</sup>, М.Р. Кабилов<sup>2</sup>, Л.В. Антонова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Сосновский бульвар, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002; <sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, пр. академика Лаврентьева, 8, Новосибирск, Российская Федерация, 630090

### Основные положения

- Колониеформирующие эндотелиальные клетки (КФЭК) рассматриваются как перспективная клеточная популяция для предварительной эндотелизации тканеинженерных медицинских изделий. При этом остается неясной степень сходства или различия между КФЭК и зрелыми сосудистыми эндотелиальными клетками, в том числе в отношении генной экспрессии. В то же время эта информация необходима для понимания перспективности длительного функционирования тканеинженерных изделий, заселенных КФЭК.
- Данная работа является первой попыткой масштабного сравнения профиля генной экспрессии КФЭК и культуры эндотелиальных клеток коронарной артерии человека, выбранных как пример зрелых эндотелиальных клеток.

<b>Цель</b>	Сравнительный анализ профиля генной экспрессии колониеформирующих эндотелиальных клеток и эндотелиальных клеток коронарной артерии человека на основе результатов полнотранскриптомного секвенирования.
<b>Материалы и методы</b>	Культура колониеформирующих эндотелиальных клеток получена из периферической крови пациентов, перенесших чрескожное коронарное вмешательство. Первичные эндотелиальные клетки коронарной артерии были приобретены у Cell Applications (300K-05a, США). Клетки лизированы тризолом с последующим выделением тотальной РНК и сопутствующей обработкой ДНК-Казой. Проводилась деплеция рРНК с дальнейшим конструированием ДНК-библиотек. Концентрация ДНК-библиотек определялась с помощью количественной полимеразной цепной реакции с детекцией результата в реальном времени на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, США). Далее ДНК-библиотеки смешивались эквимолярно и секвенировались на платформе HiSeq 2000 (Illumina, США) с длиной парно-концевых прочтений 2 × 125 нуклеотидов.
<b>Результаты</b>	Полнотранскриптомное секвенирование продемонстрировало, что колониеформирующие эндотелиальные клетки были схожи с первичными эндотелиальными клетками коронарной артерии в отношении их профиля генной экспрессии, при этом гиперэкспрессировали специфичные маркеры всех направлений эндотелиальной дифференцировки (NRP2, NOTCH4, LYVE1), в особенности лимфатической (LYVE1), и обладали повышенной экспрессией генов компонентов внеклеточного матрикса и базальной мембраны (COL1A1, COL1A2, COL4A1, COL4A2).
<b>Заключение</b>	Базовый профиль генной экспрессии колониеформирующих эндотелиальных клеток близок к таковому у эндотелиальных клеток коронарной артерии, что свидетельствует о применимости колониеформирующих эндотелиальных клеток для заселения трубчатых полимерных каркасов перед имплантацией для улучшения их кратко- и долгосрочной проходимости.
<b>Ключевые слова</b>	Колониеформирующие эндотелиальные клетки • Мононуклеарная фракция периферической крови • Эндотелиальные клетки коронарной артерии • Генная экспрессия • Полнотранскриптомное секвенирование • Транскриптомное профилирование • Транскриптомные сигнатуры

Поступила в редакцию: 26.02.2020; поступила после доработки: 13.03.2020; принята к печати: 22.03.2020

Для корреспонденции: Елена Анатольевна Великанова, velikanova\_ea@mail.ru; адрес: Сосновский бульвар, 6, Кемерово, Россия, 650002

Corresponding author: Elena A. Velikanova, velikanova\_ea@mail.ru; address: 6, Sosnoviy blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

## COMPARISON OF GENE EXPRESSION PROFILES OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD DERIVED ENDOTHELIAL COLONY-FORMING CELLS AND CORONARY ARTERY ENDOTHELIAL CELLS

E.A. Velikanova<sup>1</sup> ✉, A.G. Kutikhin<sup>1</sup>, V.G. Matveeva<sup>1</sup>, A.E. Tupikin<sup>2</sup>, M.R. Kabilov<sup>2</sup>, L.V. Antonova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", 6, Sosonoviy Blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002; <sup>2</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 8, Lavrentiev Avenue, Novosibirsk, Russian Federation, 630090

### Highlights

- Colony-forming endothelial cells (CFEC) are considered to be a promising cell population for preliminary endothelization of tissue-engineered medical devices. However, the degree of similarity/difference between CFEC and mature vascular endothelial cells, including relation to gene expression, remains unclear. At the same time, this information is necessary to understand the prospects for long-term functioning of tissue engineered products populated by CFEC.
- This study is the first attempt at a large-scale comparison of gene expression profiles of CFEC and endothelial cells culture of human coronary artery, selected as an example of mature endothelial cells.

<b>Aim</b>	To compare gene expression profiles of CFEC to human coronary artery endothelial cells, based on the results of whole transcriptome analysis.
<b>Methods</b>	CFEC were isolated from peripheral blood of patients during percutaneous coronary intervention. Human coronary artery endothelial cells were purchased from Cell Applications (300K-05a, USA). Cells were lysed with TRIzol with the following total RNA isolation and DNase treatment. Then rRNA depletion was performed, followed by DNA library preparation. DNA libraries were then quantified by qPCR (CFX96 Touch, Bio-Rad, USA), pooled in equimolar amounts and sequenced (HiSeq 2000, Illumina) using 2 × 125 bp chemistry.
<b>Results</b>	RNA-seq demonstrated that CFEC were generally similar to human coronary artery endothelial cells, regarding their global gene expression profile. However, CFEC overexpressed specific markers of all endothelial lineages (NRP2, NOTCH4, LYVE1), in particular, lymphatic EC (LYVE1) and had upregulated extracellular matrix and basement membrane genes (COL1A1, COL1A2, COL4A1, COL4A2).
<b>Conclusion</b>	Baseline gene expression in CFEC is close to that of human coronary artery endothelial cells, testifying about their utility for the seeding of tubular scaffolds before the implantation to improve their short- and long-term performance.
<b>Keywords</b>	Colony-forming endothelial cells • Peripheral blood mononuclear cells • Coronary artery endothelial cells • Gene expression • RNA-seq • Transcriptome profiling • Transcriptomic signatures

*Received: 26.02.2020; received in revised form: 13.03.2020; accepted: 22.03.2020*

### Список сокращений

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота	РНК – рибонуклеиновая кислота
ДЭГ – дифференциально экспрессированные гены	ЭК – эндотелиальные клетки
КФЭК – колониеформирующие эндотелиальные клетки	НСАЕС – эндотелиальные клетки коронарной артерии
	RIN – индекс целостности РНК

### Введение

Ограниченный выбор аутологических сосудов, которые могут быть использованы при аортокоронарном шунтировании, определяет потребность в искусственных протезах сосудов малого диаметра. Наиболее перспективными представляются разработки тканеинже-

нерных кровеносных сосудов на основе биodeградируемого полимерного каркаса, которые предполагают постепенное замещение материала графта тканями образующегося на его месте сосуда [1].

Поскольку основной проблемой имеющих на сегодняшний день разработок протезов сосудов

малого диаметра является тромбоз, чрезвычайно важное значение приобретает ранняя эндотелизация поверхности протеза [2–5], в том числе заселение поверхности эндотелиальными клетками (ЭК) в условиях *in vitro*.

Среди большого количества потенциальных источников клеток для заселения графтов привлекают внимание колониеформирующие эндотелиальные клетки (КФЭК), которые обладают высоким ангиогенным и пролиферативным потенциалом [6] и могут быть выделены из мононуклеарной фракции крови [7, 8]. В целом вопрос наиболее подходящего для использования в тканевой инженерии типа эндотелиальных клеток является дискуссионным. Артериальные, венозные и лимфатические ЭК имеют существенные различия в их транскриптоме, и степень гетерогенности ЭК является предметом активного изучения [9, 10]. Поскольку адекватное функционирование сосудистого протеза напрямую зависит от функционирования эндотелиального монослоя, обеспечивающего контроль тонуса сосудов и паракринную регуляцию гомеостаза [11, 12], важно соответствие выбранной культуры эндотелиальному фенотипу и профилю генной экспрессии, характерному для зрелых ЭК.

Для оценки применимости КФЭК для эндотелизации сосудистых графтов *in vitro* впервые изучен профиль генной экспрессии дифференцированных из мононуклеарной фракции периферической крови человека КФЭК в сравнении с первичными ЭК коронарной артерии (НСАЕС) методом полнотранскриптомного секвенирования.

## Материалы и методы

### Культивирование клеток

Дизайн исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ «НИИ КПССЗ», пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Периферическая кровь (20 мл) получена у 8 пациентов, перенесших чрескожное коронарное вмешательство в ФГБНУ «НИИ КПССЗ» (Кемерово, Россия). Выделение и обогащение КФЭК проводилось по модифицированному протоколу M. Kolbe с соавт. [13]. КФЭК выделяли с использованием градиента фикола (Histopaque 1077, 10771, Sigma-Aldrich, США). Затем клетки ресуспендировали в культуральной среде EGM-2MV (CC-3202, Lonza, Швейцария), содержащей 5% фетальной бычьей сыворотки (SH3007103, NuClone, GE Healthcare, США) и высевали в покрытые коллагеном культуральные флаконы (356484, Corning, США). После недели культивирования клетки пересеивали в покрытые фибронектином планшеты (354402, Corning). Клетки снимали с поверхности раствором аккутазы (Sigma-Aldrich), дальнейший пересев производился по достижении 70–80% конfluence. Иммунофенотипирова-

ние и функциональный анализ полученной культуры КФЭК проводили на 19–22-е дни культивирования.

Первичные ЭК коронарной артерии человека приобретены у Cell Applications (300K-05a, США) и культивировались в соответствии с инструкцией производителя.

### Полнотранскриптомное секвенирование

Для полнотранскриптомного секвенирования (RNA-seq) использовали КФЭК и НСАЕС в количестве приблизительно 10 млн клеток для каждой культуры. Клетки были лизированы тризолом (15596018, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США) с последующим выделением тотальной рибонуклеиновой кислоты (РНК) при помощи набора Purelink RNA Micro Scale Kit (12183016, Invitrogen) с сопутствующей обработкой ДНКазой (DNASE70, Sigma-Aldrich). Качество РНК контролировалось с помощью набора RNA 6000 Pico Kit (5067–1513, Agilent, США) на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent) по индексу целостности РНК (RNA integrity number, RIN). Оценка количества выделенной РНК проводилась на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) и флуорометре Qubit 4 (Invitrogen). Для 1 мкг выделенной РНК проводилась деплеция рРНК посредством набора RiboCop rRNA Depletion Kit V1.2 (037.96, Lexogen, США) с дальнейшим конструированием ДНК-библиотек (дезоксирибонуклеиновой кислоты) при помощи набора SENSE Total RNA-Seq Library Prep Kit (042.96, Lexogen). Для каждого образца РНК использовался определенный баркод. Качество полученных ДНК-библиотек анализировалось с помощью набора High Sensitivity DNA Kit (5067–4626, Agilent) на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent). Концентрация ДНК-библиотек определялась с помощью количественной полимеразной цепной реакции с детекцией результата в реальном времени на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, США). Далее ДНК-библиотеки смешивались эквимолярно и секвенировались на платформе HiSeq 2000 (Illumina, США) с длиной парно-концевых прочтений  $2 \times 125$  нуклеотидов.

Полученные прочтения фильтровались по качеству (QV >20), длине (>20), также удалялись адаптерности с помощью программы TrimGalore v.0.4.4 (Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Великобритания). После фильтрации среднее количество ридов превышало 10 млн. Их картирование на геном человека (hg38) с аннотацией Ensembl (v.38.93) проводилось с использованием программы CLC GW 11.0 (Qiagen) со следующими параметрами: Similarity fraction = 0.8, Length fraction = 0.8, Mismatch cost = 2, Insertion cost = 3, Deletion cost = 3; в итоге получены файлы в формате .bam. Для оценки дифференциальной экспрессии генов (ДЭГ) использовался мультифакторный статистический анализ в программе CLC GW 11.0, основанный на отрицательной биномиальной модели.

Значение индекса целостности РНК (RIN), выделенной из вышеуказанных клеточных популяций, во всех случаях было не менее 8 (табл. 1), что свидетельствовало о ее высоком качестве и возможности использования для RNA-seq (рекомендуемое RIN  $\geq 7$ ). Количество полученной тотальной РНК во всех образцах составляло не менее 29 мкг, что было более чем достаточным для проведения деплеции рРНК (рекомендуется  $\geq 1$  мкг). В результате секвенирования ДНК-библиотек получены парные прочтения длиной 125 нуклеотидов, общий объем которых варьировал в диапазоне 1–4 млрд пар оснований, а покрытие составляло 9,5–42,7 млн ридов. После фильтрации прочтений по качеству и длине, а также удаления адаптеров их количество практически не изменилось. Картирование прочтений библиотек на геном человека показало, что не менее 97,2% ридов во всех образцах соответствовали геному человека. При этом большая часть (70,3–93,2%) прочтений приходилась на экзоны, т. е. белок-кодирующую часть генов.

### Статистический анализ

Статистический анализ проведен в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software). Группы сравнивались по U-критерию Манна – Уитни. Значения  $p < 0,05$  признавались статистически значимыми.

При анализе различий между клеточными культурами статистически значимые ДЭГ определялись по кратности изменения  $\geq 2$  и скорректированному с учетом средней доли ложных отклонений гипотез (False discovery rate, FDR) значению  $p < 0,05$ . Анализ обогащения набора генов на основе «Генной онтологии» (Gene Ontology) проводился в категориях молекулярных функций, биологических процессов и клеточных компонентов с использованием Gene Set Test в CLC GW. При сравнении групп клеток в рассмотрении принимались категории с поддерж-

кой  $p < 0,05$  (FDR) и отношением ДЭГ к общему количеству генов более 50%.

### Результаты

Как показано нами ранее, полученная из периферической крови культура КФЭК обладала фенотипом эндотелиальных клеток, демонстрировала характерные функциональные особенности (образование микротубулярных структур, поглощение ацетилированных липопротеинов низкой плотности и связывание лектина) и выраженный пролиферативный потенциал [14].

Следующим этапом работы стал сравнительный анализ базового профиля генной экспрессии КФЭК и НСАЕС. Классификационный анализ полученных данных с использованием базы данных «Генной онтологии» в отношении функции кодируемых генами молекул выявил статистически значимые различия в профиле генной экспрессии лишь в отношении повышенной экспрессии генов, кодирующих рецепторы к VEGF (4 ДЭГ из 6 относящихся к данной категории) между КФЭК и НСАЕС (табл. 2). Статистически значимых различий между КФЭК и НСАЕС в отношении функции кодируемых генами составляющих клеточные компоненты белков и регулируемых генами биологических процессов не выявлено.

Анализ ДЭГ в отношении их функции в эндотелии показал, что КФЭК в сравнении с НСАЕС обладали более высокой базовой экспрессией генов, кодирующих панэндотелиальные маркеры KDR (в 2,2 раза) и VWF (в 3,9 раза) (кодируют VEGFR2 и фактор фон Виллебранда соответственно), характеристичный маркер эндотелиальных прогениторных клеток CD34 (в 23,9 раза), маркеры венозного эндотелия (ген *NRP2*, в 7,9 раза) и лимфатического эндотелия (гены *FLT4* и *LYVE1*, в 11,6 и 45,7 раза соответственно), а также субъединицы основного белка базальной мембраны эндотелия коллагена IV типа

**Таблица 1.** Контроль качества РНК, ДНК-библиотек и результатов секвенирования  
**Table 1.** Quality control of RNA, DNA libraries, and RNA-seq results

Образец / Sample ID	РНК, мкг / RNA, $\mu\text{g}$	RIN	ДНК-библиотеки, нуклеотидов / DNA library average length, nucleotides	Покрытие, млн ридов / Coverage, million reads	Процент прочтений (hg38) / Percent of reads mapped to hg38	Процент прочтений (экзоны) / Percent of reads mapped to exons
<i>КФЭК / CFEC</i>						
P1	48,8	9,7	356	15,7	98,2	84,9
P2	34,0	9,2	354	14,5	98,4	84,5
P3	37,2	9,0	389	42,7	98,2	82,2
P4	31,8	9,4	360	9,5	98,2	84,1
<i>НСАЕС</i>						
K1	41,4	9,4	392	25,7	98,3	93,2
K2	32,4	9,5	359	18,5	98,4	88,7
K3	37,8	9,0	360	18,7	98,1	82,5
K4	31,2	9,4	396	10,6	97,2	86,3

**Примечание:** ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; КФЭК – колониеформирующие эндотелиальные клетки; РНК – рибонуклеиновая кислота; НСАЕС – эндотелиальные клетки коронарной артерии; RIN – индекс целостности РНК.

**Note:** DNA – deoxyribonucleic acid; CFEC – colony-forming endothelial cells; HCAEC – human coronary artery endothelial cells; RIN – RNA integrity number; RNA – ribonucleic acid.

(*COL4A1* и *COL4A2*, в 2,5 и 3 раза соответственно) и субъединицы основного коллагена экстрацеллюлярного матрикса (*COL1A1* и *COL1A2*, в 926 и 43,5 раза соответственно). В свою очередь, НСАЕС характеризовались повышенной экспрессией гена транскрипционного фактора Notch-пути *HEY2* (в 523 раза), а также гена эндотелиальной нитрооксидсинтазы *NOS3* (в 4,9 раза) и гена *FLT1* (кодирует VEGFR1, в 3,9 раза).

Сравнение профиля генной экспрессии КФЭК и НСАЕС по мануально аннотированным категориям показало, что КФЭК гиперэкспрессируют гены, кодирующие белки, обеспечивающие развитие кровеносных сосудов (5 ДЭГ против 0 гиперэкспрессированных у НСАЕС), однако НСАЕС характеризуются большим количеством ДЭГ, кодирующих белки, ответственные за целостность эндотелиального барьера (15 против 8 гиперэкспрессированных у КФЭК); по остальным категориям значимых различий не выявлено.

Исходя из базового профиля дифференциально экспрессированных между двумя изученными популяциями эндотелиальных клеток генов можно предположить, что КФЭК характеризуются усиленным синтезом белков базальной мембраны (коллагена IV типа) и экстрацеллюлярного матрикса (коллагена I типа), а также экспрессируют маркеры всех трех направлений эндотелиальной дифференцировки (артериальной, венозной и лимфатической).

## Обсуждение

КФЭК представляют собой клеточную популяцию, которая может быть получена из различных источников: периферической и пуповинной крови, плаценты [15–17], костного мозга [18], белой жировой ткани [19], периферической легочной ткани [20], индуцированных плюрипотентных стволовых или эмбриональных стволовых клеток [21]. Эта культура

характеризуется эндотелиальным иммунофенотипом ( $CD31^+$ ,  $vWF^+$ ,  $KDR^+$ ,  $CD146^+$ ,  $CD45^-$ ), способностью к интернализации ацетилированных липопротеинов низкой плотности и связыванию агглютинаина *Ulex Europaeus*, а также выраженной васкулогенной и пролиферативной активностью [6, 22]. Сочетание эндотелиального фенотипа с высоким пролиферативным и неоваскуляризационным потенциалом позволяет рассматривать КФЭК как эффективный инструмент регенеративной медицины, в том числе предварительной эндотелизации и васкуляризации [23] тканеинженерных прототипов медицинских изделий. В то же время применимость КФЭК для вышеуказанных задач в значительной степени зависит от их сходства со зрелыми сосудистыми ЭК, к примеру НСАЕС, что особенно важно при заселении внутренней поверхности сосудистых графтов малого диаметра.

КФЭК ожидаемо были схожими с НСАЕС (470 ДЭГ). Анализ по категориям «Генной онтологии» не выявил значимых различий; в то же время мануальное аннотирование ДЭГ показало, что КФЭК гиперэкспрессируют маркеры всех трех направлений эндотелиальной дифференцировки ( $KDR$ ,  $vWF$ ,  $CD34$ ,  $NRP2$ ,  $FLT4$  и  $LYVE1$ ) в сравнении с НСАЕС. Такой тип экспрессии подразумевает, что КФЭК могут быть дифференцированы в артериальный, венозный или лимфатический эндотелий и ближе к последнему, чем к НСАЕС вследствие более высокой экспрессии маркера лимфатического эндотелия  $LYVE1$ . Более того, КФЭК гиперэкспрессировали маркер венозного эндотелия  $NRP2$  в сравнении со НСАЕС, предполагая их промежуточную иерархию между артериальными и венозными ЭК. Это подтверждается повышенной экспрессией генов *COL1A1*, *COL1A2*, *COL4A1* и *COL4A2* в КФЭК по сравнению с НСАЕС, что свидетельствует о повышенном синтезе КФЭК компонентов эндотелиальной базальной мембраны.

**Таблица 2.** Анализ обогащения набора генов на основе «Генной онтологии» для ДЭГ между КФЭК и НСАЕС (соотношение ДЭГ к общему количеству генов в термине более 50%)

**Table 2.** Functional enrichment analysis of DEGs between CFEC and HCAEC according to the GO categories (only categories with the proportion of DEGs within the GO term to the total number of genes within the GO term > 50% showed)

Термин GO / GO term	Количество ДЭГ внутри термина / Number of differentially expressed genes within the GO term	Общее количество генов внутри термина / Total number of genes within the GO term	Доля ДЭГ внутри термина от общего количества генов в термине / Proportion of DEGs within the GO term to the total number of genes within the GO term
<i>Классификация генов в отношении функции кодируемых ими молекул / GO Molecular function</i>			
Активность VEGF-активируемых рецепторов / Vascular endothelial growth factor-activated receptor activity	4	6	66,7%
<i>Классификация генов в отношении функции регулируемых ими биологических процессов / GO Biological process</i>			
Регуляция пролиферации мезангиальных клеток клубочков / Regulation of glomerular mesangial cell proliferation	3	5	60%

**Примечание:** ДЭГ – дифференциально экспрессированные гены; КФЭК – колониеформирующие эндотелиальные клетки; НСАЕС – эндотелиальные клетки коронарной артерии.

**Note:** DEGs – differentially expressed genes; CFEC – colony-forming endothelial cells; GO – Gene Ontology; HCAEC – human coronary artery endothelial cells.

## Заключение

Базовый профиль генной экспрессии колониеформирующих эндотелиальных клеток близок к таковому у эндотелиальных клеток коронарной артерии и связан с проявлением эндотелиального фенотипа. Показана повышенная способность КФЭК к организации эндотелиальной базальной мембраны. Следовательно, колониеформирующие эндотелиальные клетки могут быть подходящей клеточной популяцией для эндотелизации биодеградируемых сосудистых графтов *in vitro*.

## Конфликт интересов

Е.А. Великанова заявляет об отсутствии конфликта

интересов. А.Г. Кутихин заявляет об отсутствии конфликта интересов. В.Г. Матвеева заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.Е. Тупикин заявляет об отсутствии конфликта интересов. М.Р. Кабилов заявляет об отсутствии конфликта интересов. Л.В. Антонова заявляет об отсутствии конфликта интересов.

## Финансирование

Исследование проведено в рамках гранта РФФИ № 17-75-20004 «Разработка физиологически обоснованной технологии изготовления персонифицированного тканеинженерного сосудистого импланта малого диаметра *in vitro* в условиях имитации естественного кровотока с использованием клеточных технологий».

### Информация об авторах

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

*Кутихин Антон Геннадьевич*, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

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

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

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

*Антонова Лариса Валерьевна*, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-8874-0788

### Вклад авторов в статью

*ВЕА* – вклад в дизайн исследования, получение данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

### Author Information Form

*Velikanova Elena A.*, PhD, researcher at the Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1079-1956

*Kutikhin Anton G.*, PhD, Head of the Laboratory of Fundamental Aspects of Atherosclerosis, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-8679-4857

*Matveeva Vera G.*, PhD, senior researcher at the Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4146-3373

*Tupikin Alexey E.*, research assistant at the Center for Collective Use “Genomics”, Federal State Budgetary Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-8194-0322

*Kabilov Marcel R.*, PhD, Head of the Center for Collective Use “Genomics”, Federal State Budgetary Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-2777-0833

*Antonova Larisa V.*, PhD, Head of the Laboratory of Cell Technologies, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-8874-0788

### Author Contribution Statement

*VEA* – contribution to the design of the study, data collection, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content;

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

*МВГ* – получение и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*ТАЕ* – получение и анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*КМР* – вклад в дизайн исследования, анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*АЛВ* – анализ и интерпретация данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

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

*MVG* – data collection and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

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

*KMR* – contribution to the design of the study, data analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content;

*ALV* – data analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Song H.G., Rumma R.T., Ozaki C.K., Edelman E.R., Chen C.S. Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise. *Cell Stem Cell*. 2018;22(3):340-354. doi: 10.1016/j.stem.2018.02.009.
- Antonova L.V., Sevostyanova V.V., Mironov A.V., Krivkina E.O., Velikanova E.A., Matveeva V.G., Glushkova T.V., Elgudin Y.L., Barbarash L.S. In situ vascular tissue remodeling using biodegradable tubular scaffolds with incorporated growth factors and chemoattractant molecules. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2018;7(2):25-36.
- Tara S., Rocco K.A., Hibino N., Sugiura T., Kurobe H., Breuer C.K., Shinoka T. Vessel bioengineering. *Circ J*. 2014;78(1):12-9. doi: 10.1253/circj.CJ-13-1440.
- Dimitrievska S., Niklason L.E. Historical Perspective and Future Direction of Blood Vessel Developments. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(2): pii: a025742. doi: 10.1101/cshperspect.a025742.
- Radke D., Jia W., Sharma D., Fena K., Wang G., Goldman J., Zhao F. Tissue Engineering at the Blood-Contacting Surface: A Review of Challenges and Strategies in Vascular Graft Development. *Adv Healthc Mater*. 2018;7(15):e1701461. doi: 10.1002/adhm.201701461.
- Joo H.J., Song S., Seo H.R., Shin J.H., Choi S.C., Park J.H., Yu C.W., Hong S.J., Lim D.S. Human endothelial colony forming cells from adult peripheral blood have enhanced sprouting angiogenic potential through up-regulating VEGFR2 signaling. *Int J Cardiol*. 2015;197:33-43. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.06.013.
- Ren X., Feng Y., Guo J., Wang H., Li Q., Yang J., Hao X., Lv J., Ma N., Li W. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chem Soc Rev*. 2015;44(15):5680-742. doi: 10.1039/c4cs00483c.
- Mead L.E., Prater D., Yoder M.C., Ingram D.A. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from human blood. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2008;Chapter 2:Unit 2C.1. doi: 10.1002/9780470151808.sc02c01s6.
- Yoder M.C., Mead L.E., Prater D., Krier T.R., Mroueh K.N., Li F., Krasich R., Temm C.J., Prchal J.T., Ingram D.A. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007;109(5):1801-9. doi: 10.1182/blood-2006-08-043471.
- Hauser S., Jung F., Pietzsch J. Human Endothelial Cell Models in Biomaterial Research. *Trends Biotechnol*. 2017;35(3):265-277. doi: 10.1016/j.tibtech.2016.09.007.
- Dejana E., Hirschi K.K., Simons M. The molecular basis of endothelial cell plasticity. *Nat Commun*. 2017;8:14361. doi: 10.1038/ncomms14361.
- Campagnolo P., Tsai T.N., Hong X., Kirton J.P., So P.W., Margariti A., Di Bernardini E., Wong M.M., Hu Y., Stevens M.M., Xu Q. c-Kit+ progenitors generate vascular cells for tissue-engineered grafts through modulation of the Wnt/Klf4 pathway. *Biomaterials*. 2015;60:53-61. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.04.055.
- Kolbe M., Dohle E., Katerla D., Kirkpatrick C.J., Fuchs S. Enrichment of outgrowth endothelial cells in high and low colony-forming cultures from peripheral blood progenitors. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16(5):877-86. doi: 10.1089/ten.TEC.2009.0492.
- Matveeva V.G., Ханова М.Ю., Великанова Е.А., Антонова Л.В., Сардин Е.С., Крутицкий С.С., Барбараш О.Л. Возможность получения и характеристика колониеформирующих эндотелиальных клеток из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца. *Цитология* 2018; 60(8): 598-608
- Denecke B., Horsch L.D., Radtke S., Fischer J.C., Horn P.A., Giebel B. Human endothelial colony-forming cells expanded with an improved protocol are a useful endothelial cell source for scaffold-based tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(11):E84-97. doi: 10.1002/term.1673.
- Rapp B.M., Saadatzedeh M.R., Ofstein R.H., Bhavsar J.R., Tempel Z.S., Moreno O., Morone P., Booth D.A., Traktuev D.O., Dalsing M.C., Ingram D.A., Yoder M.C., March K.L., Murphy M.P. Resident Endothelial Progenitor Cells From Human Placenta Have Greater Vasculogenic Potential Than Circulating Endothelial Progenitor Cells From Umbilical Cord Blood. *Cell Med*. 2011;2(3):85-96. doi: 10.3727/215517911X617888.
- Patel J., Seppanen E., Chong M.S., Yeo J.S., Teo E.Y., Chan J.K., Fisk N.M., Khosrotehrani K. Prospective surface marker-based isolation and expansion of fetal endothelial colony-forming cells from human term placenta. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(11):839-47. doi: 10.5966/sctm.2013-0092.
- Solomon I., O'Reilly M., Ionescu L., Alphonse R.S., Rajabali S., Zhong S., Vadivel A., Shelley W.C., Yoder M.C., Thébaud B. Functional Differences Between Placental Micro- and Macrovascular Endothelial Colony-Forming Cells. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(3):291-300. doi: 10.5966/sctm.2014-0162.
- Yu S., Li Z., Zhang W., Du Z., Liu K., Yang D., Gong S. Isolation and characterization of endothelial colony-forming cells from mononuclear cells of rat bone marrow. *Exp Cell Res*. 2018;370(1):116-126. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.06.013.
- Lin R.Z., Moreno-Luna R., Muñoz-Hernandez R., Li D., Jaminet S.C., Greene A.K., Melero-Martin J.M. Human white adipose tissue vasculature contains endothelial colony-forming cells with robust in vivo vasculogenic potential. *Angiogenesis*. 2013;16(4):735-44. doi: 10.1007/s10456-013-9350-0.
- Alphonse R.S., Vadivel A., Zhong S., Mc Conaghy S., Ohls R., Yoder M.C., Thébaud B. The isolation and culture of endothelial colony-forming cells from human and rat lungs. *Nat Protoc*. 2015;10(11):1697-708. doi: 10.1038/nprot.2015.107.
- Prasain N., Lee M.R., Vemula S., Meador J.L., Yoshimoto M., Ferkowicz M.J., Fett A., Gupta M., Rapp B.M., Saadatzedeh M.R., Ginsberg M., Elemento O., Lee Y., Voytik-Harbin S.L., Chung H.M., Hong K.S., Reid E., O'Neill C.L., Medina R.J., Stitt A.W., Murphy M.P., Rafii S., Broxmeyer H.E., Yoder M.C. Differentiation of human pluripotent stem cells to cells similar to cord-blood endothelial colony-forming cells. *Nat Biotechnol*. 2014;32(11):1151-1157. doi: 10.1038/nbt.3048.
- Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G., Minick C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*. 1973;52(11):2745-56. doi: 10.1172/JC1107470.

## REFERENCES

1. Song H.G., Rumma R.T., Ozaki C.K., Edelman E.R., Chen C.S. Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise. *Cell Stem Cell*. 2018;22(3):340-354. doi: 10.1016/j.stem.2018.02.009.
2. Antonova L.V., Sevostyanova V.V., Mironov A.V., Krivkina E.O., Velikanova E.A., Matveeva V.G., Glushkova T.V., Elgudin Y.L., Barbarash L.S. In situ vascular tissue remodeling using biodegradable tubular scaffolds with incorporated growth factors and chemoattractant molecules. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2018;7(2):25-36.
3. Tara S., Rocco K.A., Hibino N., Sugiura T., Kurobe H., Breuer C.K., Shinoka T. Vessel bioengineering. *Circ J*. 2014;78(1):12-9. doi: 10.1253/circj.CJ-13-1440.
4. Dimitrievska S., Niklason L.E. Historical Perspective and Future Direction of Blood Vessel Developments. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(2): pii: a025742. doi: 10.1101/cshperspect.a025742.
5. Radke D., Jia W., Sharma D., Fena K., Wang G., Goldman J., Zhao F. Tissue Engineering at the Blood-Contacting Surface: A Review of Challenges and Strategies in Vascular Graft Development. *Adv Healthc Mater*. 2018;7(15):e1701461. doi: 10.1002/adhm.201701461.
6. Joo H.J., Song S., Seo H.R., Shin J.H., Choi S.C., Park J.H., Yu C.W., Hong S.J., Lim D.S. Human endothelial colony forming cells from adult peripheral blood have enhanced sprouting angiogenic potential through up-regulating VEGFR2 signaling. *Int J Cardiol*. 2015;197:33-43. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.06.013.
7. Ren X., Feng Y., Guo J., Wang H., Li Q., Yang J., Hao X., Lv J., Ma N., Li W. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chem Soc Rev*. 2015;44(15):5680-742. doi: 10.1039/c4cs00483c.
8. Mead L.E., Prater D., Yoder M.C., Ingram D.A. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from human blood. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2008;Chapter 2:Unit 2C.1. doi: 10.1002/9780470151808.sc02c01s6.
9. Yoder M.C., Mead L.E., Prater D., Krier T.R., Mroueh K.N., Li F., Krasich R., Temm C.J., Prchal J.T., Ingram D.A. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007;109(5):1801-9. doi: 10.1182/blood-2006-08-043471.
10. Hauser S., Jung F., Pietzsch J. Human Endothelial Cell Models in Biomaterial Research. *Trends Biotechnol*. 2017;35(3):265-277. doi: 10.1016/j.tibtech.2016.09.007.
11. Dejana E., Hirschi K.K., Simons M. The molecular basis of endothelial cell plasticity. *Nat Commun*. 2017;8:14361. doi: 10.1038/ncomms14361.
12. Campagnolo P., Tsai T.N., Hong X., Kirton J.P., So P.W., Margariti A., Di Bernardini E., Wong MM, Hu Y, Stevens MM, Xu Q. c-Kit<sup>+</sup> progenitors generate vascular cells for tissue-engineered grafts through modulation of the Wnt/Klf4 pathway. *Biomaterials*. 2015;60:53-61. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.04.055.
13. Kolbe M., Dohle E., Katerla D., Kirkpatrick C.J., Fuchs S. Enrichment of outgrowth endothelial cells in high and low colony-forming cultures from peripheral blood progenitors. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16(5):877-86. doi: 10.1089/ten.TEC.2009.0492.
14. Matveeva V.G., Khanova M. Yu., Velikanova E.A., Antonova L.V., Sardin E.S., Krutitsky S.S., Barbarash O.L. Isolation and characteristics of colony-forming endothelial cells from peripheral blood in patients with ischemic heart disease. *Tsitologiya*. 2018; 60(8): 598-608 (In Russian)
15. Denecke B., Horsch L.D., Radtke S., Fischer J.C., Horn P.A., Giebel B. Human endothelial colony-forming cells expanded with an improved protocol are a useful endothelial cell source for scaffold-based tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(11):E84-97. doi: 10.1002/term.1673.
16. Rapp B.M., Saadatzedeh M.R., Ofstein R.H., Bhavsar J.R., Tempel Z.S., Moreno O., Morone P., Booth D.A., Traktuev D.O., Dalsing M.C., Ingram D.A., Yoder M.C., March K.L., Murphy M.P. Resident Endothelial Progenitor Cells From Human Placenta Have Greater Vasculogenic Potential Than Circulating Endothelial Progenitor Cells From Umbilical Cord Blood. *Cell Med*. 2011;2(3):85-96. doi: 10.3727/215517911X617888.
17. Patel J., Seppanen E., Chong M.S., Yeo J.S., Teo E.Y., Chan J.K., Fisk N.M., Khosrotehrani K. Prospective surface marker-based isolation and expansion of fetal endothelial colony-forming cells from human term placenta. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(11):839-47. doi: 10.5966/sctm.2013-0092.
18. Solomon I., O'Reilly M., Ionescu L., Alphonse R.S., Rajabali S., Zhong S., Vadivel A., Shelley W.C., Yoder M.C., Thébaud B. Functional Differences Between Placental Micro- and Macrovascular Endothelial Colony-Forming Cells. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(3):291-300. doi: 10.5966/sctm.2014-0162.
19. Yu S., Li Z., Zhang W., Du Z., Liu K., Yang D., Gong S. Isolation and characterization of endothelial colony-forming cells from mononuclear cells of rat bone marrow. *Exp Cell Res*. 2018;370(1):116-126. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.06.013.
20. Lin R.Z., Moreno-Luna R., Muñoz-Hernandez R., Li D., Jaminet S.C., Greene A.K., Melero-Martin J.M. Human white adipose tissue vasculature contains endothelial colony-forming cells with robust in vivo vasculogenic potential. *Angiogenesis*. 2013;16(4):735-44. doi: 10.1007/s10456-013-9350-0.
21. Alphonse R.S., Vadivel A., Zhong S., Mc Conaghy S., Ohls R., Yoder M.C., Thébaud B. The isolation and culture of endothelial colony-forming cells from human and rat lungs. *Nat Protoc*. 2015;10(11):1697-708. doi: 10.1038/nprot.2015.107.
22. Prasain N., Lee M.R., Vemula S., Meador J.L., Yoshimoto M., Ferkowicz M.J., Fett A., Gupta M., Rapp B.M., Saadatzedeh M.R., Ginsberg M., Elemento O., Lee Y., Voytk-Harbin S.L., Chung H.M., Hong K.S., Reid E., O'Neill C.L., Medina R.J., Stitt A.W., Murphy M.P., Rafii S., Broxmeyer H.E., Yoder M.C. Differentiation of human pluripotent stem cells to cells similar to cord-blood endothelial colony-forming cells. *Nat Biotechnol*. 2014;32(11):1151-1157. doi: 10.1038/nbt.3048.
23. Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G., Minick C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*. 1973;52(11):2745-56. doi: 10.1172/JCI107470.

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

**To cite:** E.A. Velikanova, A.G. Kutikhin, V.G. Matveeva, A.E. Tupikin, M.R. Kabilov, L.V. Antonova. Comparison of gene expression profiles of human peripheral blood derived endothelial colony-forming cells and coronary artery endothelial cells. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2020; 9 (2): 74-81. DOI: 10.17802/2306-1278-2020-9-2-74-81