

**ОЦЕНКА ПАРАКРИННЫХ ЭФФЕКТОВ КОНДИЦИОНИРОВАННОЙ СРЕДЫ
В ХОДЕ ЕЕ ПЕРЕКРЕСТНОГО ДОБАВЛЕНИЯ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЙ
СИСТЕМЕ “КОНДУИТ–АРТЕРИЯ”**

© 2022 г. А. В. Фролов¹, Д. К. Шишкова¹, В. Е. Маркова¹*, М. Ю. Сеницкий¹,
А. В. Сеницкая¹, А. О. Поддубняк¹, А. Ю. Канонькина¹, Н. И. Загородников¹,
Е. В. Григорьев¹, А. Г. Кутихин¹

¹ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,
Кемерово, Россия

*E-mail: markve97@gmail.com

Поступила в редакцию 19.05.2022 г.

После доработки 15.07.2022 г.

Принята к публикации 22.07.2022 г.

Дисфункция эндотелия является одним из ключевых триггеров для развития болезней системы кровообращения, в том числе способствуя развитию тромбоза, рестеноза и неоатеросклероза в системе “конduit–артерия”, возникающей при соединении венозного или артериального кондукта с коронарной артерией при коронарном шунтировании. Цель исследования – провести *in vitro* моделирование взаимодействий артериальных и венозных эндотелиальных клеток системы “конduit–артерия”. Кондиционированная в течение 24 ч бессывороточная культуральная среда от монослоя первичных эндотелиальных клеток коронарной артерии человека (НСАЕС), первичных эндотелиальных клеток внутренней грудной артерии человека (НТАЕС) и первичных эндотелиальных клеток большой подкожной вены человека (НСaVEC) была перекрестно добавлена к интактному монослою тех же линий клеток на 24 ч. Далее был проведен анализ геной и белковой экспрессии в культурах эндотелиальных клеток, а также анализ профиля секретируемых ими в культуральную среду цитокинов, про- и антиангиогенных факторов. Анализ геной экспрессии показал, что добавление культуральной среды от НТАЕС снижало выраженность стимулирующего клеточную адгезию провоспалительного ответа в НСАЕС, в то время как добавление культуральной среды от НСаVEC, напротив, активировало транскрипцию в НСАЕС генов провоспалительных цитокинов. В свою очередь, добавление культуральной среды от НСАЕС способствовало поддержанию эндотелиального фенотипа НТАЕС. Кондиционированная среда от артериальных эндотелиальных клеток стимулировала выделение про-ангиогенных молекул при воздействии на НСАЕС и НСаVEC, но не НТАЕС. Добавление кондиционированной среды от НСаVEC приводило к значимому снижению концентрации провоспалительного цитокина интерлейкина-6 во всех трех сценариях. Взаимодействия артериальных эндотелиальных клеток в модели НТАЕС–НСАЕС препятствуют их провоспалительной активации и увеличивают ангиогенный потенциал НСАЕС, что частично объясняет повышенную проходимость артериальных кондуктов и устойчивость связанной с ними коронарной артерии к тромбозу, рестенозу и неоатеросклерозу в отдаленном послеоперационном периоде после коронарного шунтирования.

Ключевые слова: эндотелиальные клетки, коронарное шунтирование, паракринные эффекты, кондиционированная среда, коронарная артерия, большая подкожная вена, внутренняя грудная артерия

DOI: 10.31857/S0869813922080039

Сосудистые эндотелиальные клетки образуют внутреннюю выстилку всех кровеносных сосудов, как крупных – вен и артерий, так и мелких – артериол, венул и капилляров. Поскольку сосуды артериального и венозного русла имеют совершенно различное функциональное значение, фенотип и физиологический профиль экспрессии их клеточных популяций, в том числе эндотелиальные клетки, также существенно отличается [1, 2]. Эндотелиальные клетки артериальных и венозных сосудов выделяют большое количество различных регуляторных молекул, позволяющих регулировать проницаемость эндотелиального монослоя, транспорт макромолекул (в том числе атерогенных липопротеинов) и гемостаз, а также участвующих в модулировании клеточной адгезии и в процессах воспаления [3]. Различие в разнообразии выделяемых в микроокружение и в системный кровоток биоактивных факторов наблюдается не только между венами и артериями, но и между разными гистологическими типами артерий и даже между разными сегментами одной и той же артерии в зависимости от их геометрии [2, 4].

На сегодняшний день лучшим кондуитом для коронарного шунтирования – хирургического вмешательства с целью создания обходного пути (шунта) для восстановления коронарного кровотока – считается внутренняя грудная артерия (ВГА), поскольку она относительно устойчива к развитию атеросклероза, что обеспечивает ее проходимость даже в отдаленном послеоперационном периоде [5, 6]. Вместе с тем, хотя артериальные кондуиты демонстрируют более высокие показатели проходимости, чем венозные (в частности большая подкожная вена, БПВ), именно последние используются наиболее часто, поскольку их легче извлекать и проводить с ними хирургические манипуляции, а их длина позволяет осуществлять анатомическое соединение с любой коронарной артерией и производить сегментирование на несколько графтов. Несмотря на совершенствование хирургической техники и последующего медикаментозного лечения, а также технологий реабилитации и преа-билитации, долгосрочная эффективность шунтов из подкожных вен остается ограниченной вследствие полной или гемодинамически значимой окклюзии (рестеноза) кондуитов или продолжающегося прогрессирования атеросклероза коронарных артерий (КА) [7–9]. Таким образом, оптимальная стратегия реваскуляризации сердечной ткани при помощи коронарного шунтирования все еще остается предметом активных дискуссий кардиохирургов и физиологов.

Для оценки особенности взаимодействий между артериальными и венозными эндотелиальными клетками в формирующейся при коронарном шунтировании морфофункциональной системе “кондуит–артерия” ранее нами была осуществлена работа по сокультивированию трех клеточных линий – эндотелиальных клеток КА (в англоязычной терминологии – HCAEC, от human coronary artery endothelial cells), эндотелиальных клеток ВГА (в англоязычной терминологии – HITAEC, от human internal thoracic artery endothelial cells) и эндотелиальных клеток БПВ (в англоязычной терминологии – HSAVEC, от human saphenous vein endothelial cells). Сокультивирование HCAEC и HITAEC взаимно способствовало экспрессии эндотелиальной синтазы монооксида азота (eNOS) и поддержанию эндотелиального фенотипа, снижая экспрессию транскрипционных факторов эндотелиально-мезенхимального перехода и повышая экспрессию транскрипционных факторов артериальной дифференцировки. Сокультивирование HCAEC и HSAVEC также индуцировало артериальное репрограммирование HSAVEC. Кроме того, сокультивирование HCAEC и HITAEC приводило к повышенному выделению про-ангиогенных молекул в микроокружение, вероятно, способствуя сосудистой регенерации. На основании этих результатов было предположено, что паракринные взаимодействия HCAEC и эндотелиальных клеток кондуита (HITAEC или HSAVEC) могут влиять на сосудистый гомеостаз после коронарного шунтирования и, при их

благодаря благотворному влиянию, могут лежать в основе повышенной проходимости артериальных кондуитов в отдаленном периоде [10].

Несмотря на определенные преимущества модели сокультивирования артериальных и венозных эндотелиальных клеток (в частности прямое воздействие клеточных линий друг на друга), ее недостатком является отсутствие технической возможности отделить культуральную среду, кондиционированную конкретным типом эндотелиальных клеток (то есть среду, в которую выделяет внеклеточные везикулы и растворимые факторы только какой-либо определенный тип эндотелиальных клеток), поскольку в культуральной посуде с вставками для сокультивирования культуральная среда неизбежно перемешивается. Поэтому данную модель также было решено дополнить моделью перекрестного добавления кондиционированной среды с целью оценки изолированного влияния артериальных и венозных эндотелиальных клеток друг на друга. Впоследствии проводилось измерение уровня молекул, ответственных за эндотелиальный гомеостаз или обуславливающих развитие дисфункции эндотелия во всех указанных клеточных линиях — HCAEC, HITAEC и HSAVEC.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первичные HCAEC (HCAEC, Cell Applications, каталожный номер 300K-05a), первичные HITAEC (HITAEC, Cell Applications, 308K-05a) и первичные HSAVEC (PromoCell, C-12231) были культивированы в среде MesoEndo Growth Medium (Cell Applications, 212-500) во флаконах T-150 (Techno Plastic Products, 90552) до формирования монослоя, после чего полная культуральная среда (Cell Applications, 212-500) для предотвращения контаминации внеклеточными везикулами из сыворотки после двукратной отмывки фосфатно-солевым буфером была заменена на бессывороточную среду с теми же факторами роста, что и в полной среде (Cell Applications, 212F-500). Через 24 ч (данный срок был обусловлен оптимальной продолжительностью сывороточной депривации, в течение которого монослой остается в неизменном виде без признаков патологического состояния клеток) указанная бессывороточная культуральная среда (кондиционированная среда, 30 мл от каждой клеточной линии) была забрана из данных флаконов и центрифугирована при 3000 g для очистки от крупного дебриса с последующим перекрестным добавлением во флаконы T-25 (Techno Plastic Products, 90026) с заранее культивированным в среде MesoEndo Growth Medium (Cell Applications, 212-500) монослоем от этих же доноров.

Таким образом, дизайн эксперимента предусматривал девять экспериментальных групп — HCAEC, к которым была добавлена кондиционированная среда от HCAEC (аутоконтроль), HITAEC и HSAVEC; HITAEC, к которым была добавлена кондиционированная среда от HCAEC, HITAEC (аутоконтроль) и HSAVEC; HSAVEC, к которым была добавлена кондиционированная среда от HCAEC, HITAEC и HSAVEC (аутоконтроль). Через 24 ч после перекрестного добавления HCAEC, HITAEC и HSAVEC во флаконах T-25 клетки были однократно отмыты в охлажденном (4°C) фосфатно-солевым буфере и далее лизированы в тризоле (15596018, Applied Biosystems) для выделения РНК или RIPA-буфере (Thermo Scientific, 89901) с коктейлем ингибиторов протеаз и фосфатаз Halt (Thermo Scientific, 78444) для выделения белка согласно инструкциям производителей. Количественная оценка и контроль качества выделенных нуклеиновых кислот проводились при помощи спектрофотометрии на приборе NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), количественная оценка белка выполнялась с использованием набора BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 23227) согласно инструкции производителя. Кондиционированная культуральная среда от этих клеток была забрана, центрифугирована при 12000 g для очистки от крупного дебриса и заморожена при -60°C для измерения уровня выделяемых

клетками молекул при помощи дот-блоттинга (скрининг) и иммуноферментного анализа (высокоточное определение).

Для измерения генной экспрессии вначале осуществлялась обратная транскрипция для синтеза кДНК (термоциклер Veriti, Applied Biosystems, набор High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, 4368814, Applied Biosystems) согласно инструкции производителя. Далее проводилась собственно количественная полимеразная цепная реакция (кПЦР) в соответствии с протоколом производителя мастер-микса (PowerUp SYBR Green Master Mix, A25777, Applied Biosystems) на приборе ViiA 7 (Applied Biosystems) в четырех повторах для каждого образца. Праймеры для кПЦР были разработаны в программе Primer-BLAST (National Institutes of Health) с использованием следующих параметров: длина ПЦР-продукта – от 70 до 150 пар оснований, температура плавления праймеров – от 59 до 65°C с различием между праймерами не более 3°C, включение интрона с длиной не менее 200 пар оснований – обязательно, длина праймера – от 18 до 22 нуклеотидов, содержание гуанина и цитозина в праймерах – от 40 до 60%, максимальная длина повтора одного и того же нуклеотида подряд – 4, максимальное содержание гуанина и цитозина на 3'-конце – не более 3 (60%), максимальная комплементарность праймеров – не более 5 условных единиц. Все остальные параметры программы соответствовали настройкам по умолчанию. Выбирались исключительно пары праймеров, специфичные к гену интереса. После разработки праймеров производился контроль их качества в программах PCR Primer Stats (Sequence Manipulation Suite, www.bioinformatics.org) и Multiple Primer Analyzer (Thermo Scientific Web Tools) на стандартных настройках. В случае обнаружения вероятных димеров разрабатывалась новая пара праймеров (до исключения всех возможных димеров). Синтез разработанных праймеров проводился в компании Евроген (Москва). В качестве референсного гена был выбран ген *PECAM1*, кодирующий обильно и стабильно экспрессируемый в ЭК рецептор CD31. Уровень экспрессии генов в артериальных и венозных эндотелиальных клетках рассчитывался при помощи $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -метода (поправка на экспрессию гена *PECAM1* в группе интереса и экспрессию гена интереса в референтной группе аутоконтроля – клеток, к которым была добавлена аутологичная кондиционированная среда). К примеру, в группе сравнений для НСАЕС контролем были НСАЕС, к которым была добавлена кондиционированная среда от НСАЕС (аналогичная схема применялась для НТАЕС и HSAVEC).

В качестве скрининговых генов были выбраны *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE* и *SELP* (рецепторы эндотелиальных клеток для лейкоцитов), *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1* и *MIF* (основные эндотелиальные провоспалительные цитокины), *NOS3* (ген эндотелиальной NO-синтазы), *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, *ZEB1*, *CDH5* и *CDH2* (транскрипционные факторы и маркеры эндотелиально-мезенхимального перехода), *HES1*, *HEY1*, *HEY2* и *NOTCH1* (транскрипционные факторы и рецептор артериальной эндотелиальной дифференцировки) и *NR2F2* (транскрипционный фактор венозной эндотелиальной дифференцировки). В таком экспериментальном дизайне повышенная экспрессия генов *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE* и *SELP* в сочетании с повышенной экспрессией генов *IL6*, *CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1* и *MIF* свидетельствует о провоспалительной активации эндотелиальных клеток, сниженная экспрессия гена *NOS3* указывает на нарушенную способность эндотелиальных клеток выделять основной вазодилататор NO, а повышенная экспрессия генов *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1* и *ZEB1* в сочетании со сниженной экспрессией гена сосудистого эндотелиального (VE) кадгерина *CDH5* и повышенной экспрессией гена мезенхимального кадгерина *CDH2* говорит об эндотелиально-мезенхимальном переходе. Сниженная экспрессия генов *HES1*, *HEY1*, *HEY2* и *NOTCH1* в сочетании с повышенной экспрессией гена *NR2F2* отражает сдвиг эндотелиальной дифференцировки от артериальной к венозной. Результаты измерения уровня генной экспрессии отображались в

виде тепловой карты (белый цвет обозначал отсутствие генной экспрессии, светло-зеленый цвет — кратность изменения (fold change) ≤ 0.5 , светло-серый цвет — от 0.51 до 1.99, светло-фиолетовый цвет — ≥ 2).

Анализ уровня цитокинов и ангиогенных факторов в культуральной среде с восемью из девяти экспериментальных групп (всех, исключая HSAVEC после добавления кондиционированной среды от НТАЕС в силу меньшей релевантности данной экспериментальной группы проверяемой гипотезе) был проведен с использованием соответствующих наборов для дот-блоттинга (ARY005B, R&D Systems; ab193655, Abcam) в соответствии с протоколами производителя. Хемилюминесцентная детекция проводилась посредством цифрового сканера блотов C-DiGit (LI-COR Biosciences) в высокочувствительном режиме (12-минутное сканирование). С целью количественной верификации полуколичественных результатов дот-блоттинга в культуральной среде также была измерена концентрация интерлейкина-6 при помощи соответствующего набора для иммуоферментного анализа (430507, BioLegend) в соответствии с протоколом производителя. Колориметрическая детекция результата была проведена при помощи спектрофотометра Multiskan Sky (Thermo Scientific) при длине волны 450 нм.

Для проведения иммуноблоттинга одинаковые количества белка (15 мкг на образец) были смешаны с буфером на основе додецилсульфата лития NuPAGE (NP0007, Invitrogen) в соотношении 4 : 1 и восстановителем NuPAGE (NP0009, Invitrogen) в соотношении 10 : 1, денатурированы при 99°C в течение 5 мин и далее загружены на гель NuPAGE 4–12% Bis-Tris толщиной 1.5 мм (NP0335BOX, Invitrogen). В качестве маркера молекулярных масс использовалась смесь белковых стандартов Novex Sharp Pre-Stained (LC5800, Invitrogen) и MagicMark XP Western в соотношении 1 : 1 (LC5602, Invitrogen). Белки разделялись путем электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) при напряжении 150 В в течение 2 ч с использованием буфера для разделения белков NuPAGE MES SDS (NP0002, Invitrogen), антиоксиданта NuPAGE (NP0005, Invitrogen) и камеры для вертикального электрофореза XCell SureLock Mini-Cell (EI0001, Invitrogen). Перенос белка выполнялся с помощью мембран из поливинилидендифторида (IB24001, Invitrogen) и прибора для сухого переноса iBlot 2 (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя в стандартном режиме для белков с молекулярной массой 30–150 кДа (P0 – 20 В в течение 1 мин, 23 В в течение 4 мин и 25 В в течение 2 мин). Мембраны далее инкубировались в растворе iBind Flex (SLF2020, Solution Kit Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) в течение 1 ч для предотвращения неспецифического связывания.

Для иммуноблоттинга использовались антитела кролика к провоспалительным молекулам клеточной адгезии VCAM1 (ab134047, 1 : 1000, Abcam) и ICAM1 (ab109361, 1 : 1000, Abcam), транскрипционному фактору эндотелиально-мезенхимального перехода ZEB1 (ab203829, 1 : 200, Abcam) и белку CD31 (контроль загрузки, ab9498, 1 : 1000, Abcam), антитела мыши к каспазе-3 (ab208161, 1 : 250, Abcam) и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназе (GAPDH, контроль загрузки, ab139416, 1 : 250, Abcam) и антитела козла к бета-тубулину (контроль загрузки, ab21057, 1 : 1000, Abcam). Конъюгированные с пероксидазой хрена вторичные антитела козла против кролика (7074, Cell Signaling Technology), козла против мыши (AP130P, Sigma-Aldrich) и осла против козла (ab205723, Abcam) были использованы в разведении 1 : 200, 1 : 1000 и 1 : 400 соответственно. Инкубирование с антителами выполнялось при помощи реагентов из набора iBind Flex (SLF2020, Invitrogen), карточек iBind Flex (SLF2010, Invitrogen) и прибора iBind Flex Western Device (SLF2000, Invitrogen) в течение 3 ч в соответствии с протоколами производителя. Хемилюминесцентная детекция проводилась с использованием субстрата SuperSignal West Pico PLUS

(34580, Thermo Scientific) и цифрового сканера блотов C-DiGit (LI-COR Biosciences) в высокочувствительном режиме (12-минутное сканирование).

Статистический анализ был выполнен в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software). Данные были представлены в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей и минимального и максимального значений. Анализ межгрупповых различий проводился с использованием критерия Краскела–Уоллиса с последующим попарным U-критерием Манна–Уитни, поправка на множественные сравнения выполнялась посредством применения средней доли ложных отклонений гипотез (false discovery rate, FDR по Беньямини, Кригеру и Йекутиели). Статистически значимой считалась вероятность отвергнуть верную нулевую гипотезу q (скорректированные с учетом FDR значения p) ≤ 0.05 .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ генной экспрессии методом ОТ-кПЦР (рис. 1) продемонстрировал: 1) относительное снижение экспрессии генов провоспалительных молекул клеточной адгезии (VCAM1, ICAM1, SELE, SELP) в сочетании с признаками артериальной транскрипции (снижение экспрессии генов артериальной дифференцировки HES1, HEY2 и NOTCH1 и повышение экспрессии гена венозной дифференцировки NR2F2) в HCAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HITAEC; 2) относительное повышение экспрессии практически всех генов провоспалительных молекул клеточной адгезии и цитокинов (VCAM1, ICAM1, SELE, SELP, CXCL8, CCL2, CXCL1, MIF), а также генов транскрипционных факторов и маркеров эндотелиально-мезенхимального перехода (SNAI1, TWIST1, ZEB1, CDH2) в HCAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HSAVEC; 3) относительное снижение экспрессии генов транскрипционных факторов эндотелиально-мезенхимального перехода (SNAI1, SNAI2, TWIST1) и артериальной дифференцировки (HES1, NOTCH1) в HITAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HCAEC; 4) относительное снижение экспрессии генов провоспалительных цитокинов (IL6, CXCL8, CCL2, CXCL1) и артериальной дифференцировки (HES1, NOTCH1) в HITAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HSAVEC; 5) относительное повышение экспрессии генов провоспалительных молекул клеточной адгезии и цитокинов (VCAM1, ICAM1, SELP, IL6, CXCL8, CXCL1, MIF) и генов эндотелиально-мезенхимального перехода (SNAI1, TWIST1, ZEB1, CDH2) в HSAVEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HCAEC и особенно HITAEC. Таким образом, на уровне генной экспрессии, по аналогии с моделью сокультивирования клеточных линий, на модели перекрестного добавления кондиционированной среды: 1) культуральная среда от HITAEC в целом оказывала благотворное действие на HCAEC, снижая их потенциальную провоспалительную активность, в то время как культуральная среда от HSAVEC, напротив, провоцировала провоспалительную активацию и эндотелиально-мезенхимальный переход HCAEC; 2) культуральная среда от HCAEC способствовала поддержанию эндотелиального фенотипа HITAEC (при этом культуральная среда от HSAVEC снижала их провоспалительный потенциал); 3) в то же время культуральная среда от артериальных эндотелиальных клеточных линий (HCAEC и особенно HITAEC) индуцировала провоспалительную активацию и эндотелиально-мезенхимальный переход в HSAVEC.

При анализе профиля цитокинов, выделяемых различными артериальными и венозными эндотелиальными клетками после перекрестного добавления к ним кондиционированной культуральной среды (рис. 2) были выявлены: 1) уникальная экспрессия провоспалительного цитокина MCP-1/CCL2 в культуральной среде от HCAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HITAEC (в сравне-

Cells		HCAEC		HITAEC		HSaVEC	
Medium		HITAEC	HSaVEC	HCAEC	HSaVEC	HCAEC	HITAEC
Cell adhesion molecules	VCAM1	Green	Purple	White	White	White	White
	ICAM1	Green	Purple	Green	White	White	White
	SELE	Green	Purple	White	White	Green	White
	SELP	Green	Purple	White	White	White	White
	IL6	Purple	Purple	Green	Green	White	White
Pro-inflammatory cytokines	CXCL8	White	Purple	White	White	White	White
	CCL2	White	Purple	Green	White	White	White
	CXCL1	White	Purple	White	Green	White	White
	MIF	Purple	Purple	White	White	White	White
No synthase	NOS3	White	Purple	White	White	White	White
Endothelial mesenchymal transition	SNAI1	Purple	Purple	Green	White	White	White
	SNAI2	Green	White	White	White	White	White
	TWIST1	White	Purple	Green	White	White	White
	ZEB1	White	Purple	White	White	White	White
	CDH5	White	Purple	White	White	White	White
Arterial to venous differentiation	CDH2	White	Purple	White	White	White	White
	HES1	Green	Purple	Green	White	White	White
	HEY1	Purple	Purple	White	White	White	White
	HEY2	Green	White	White	White	White	White
	NOTCH1	Green	Purple	Green	White	White	White
NR2F2	Purple	Purple	White	White	White	White	

Рис. 1. Сравнительное измерение генной экспрессии (количественная полимеразная цепная реакция после обратной транскрипции) в культурах HCAEC (слева), HITAEC (в центре) и HSaVEC (справа), к моносою клеток от тех же самых доноров (после центрифугирования при 3000 g для очистки от грубого клеточного дебриса) и далее выделили РНК (при помощи тризола) с последующей обратной транскрипцией до кДНК. Кондиционированная среда представляла собой культуральную среду, предварительно добавленную к моносою клеток тех же самых доноров (HCAEC, HITAEC и HSaVEC) на 24 ч. В качестве референсного гена был выбран *PECAM1* (кодирующий белок CD31), также проводилась нормализация генной экспрессии эндотелиальных клеток на величину экспрессии в аутоконтроле – клеточной линии, к которой была добавлена аутологичная кондиционированная среда ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). VCAM1, ICAM1, SELE, SELP – молекулы клеточной адгезии (рецепторы эндотелиальных клеток для лейкоцитов), повышенная экспрессия генов которых в сочетании с повышенной экспрессией генов основных эндотелиальных цитокинов (IL6, CXCL8, CCL2, CXCL1, MIF) свидетельствует о провоспалительной активации эндотелиальных клеток. NOS3 – эндотелиальная NO-синтаза, сниженная экспрессия гена которой может свидетельствовать о нарушенной способности эндотелиальных клеток выделять основную сосудорасширяющую молекулу (монооксид азота NO). SNAI1, SNAI2, TWIST1, ZEB1 – транскрипционные факторы эндотелиально-мезенхимального перехода, повышенная экспрессия генов которых в сочетании со сниженной экспрессией гена сосудистого эндотелиального (VE) кадгерина CDH5 и повышенной экспрессией гена мезенхимального кадгерина CDH2 указывает на эндотелиально-мезенхимальный переход. HES1, HEY1, HEY2 и NOTCH1 – транскрипционные факторы (HES1, HEY1, HEY2) и рецептор (NOTCH1) артериальной эндотелиальной дифференцировки, NR2F2 – транскрипционный фактор венозной эндотелиальной дифференцировки. Белый цвет обозначает отсутствие генной экспрессии, светло-зеленый цвет обозначает кратность изменения (fold change) ≤ 0.5 , светло-серый цвет – от 0.51 до 1.99, светло-фиолетовый цвет – ≥ 2 . Отсутствие экспрессии генов транскрипционных факторов артериальной эндотелиальной дифференцировки *HEY1* и *HEY2* в венозных эндотелиальных клетках (HSaVEC) указывает на техническую валидность проведенного анализа генной экспрессии (стоит отметить, что HITAEC также не экспрессируют эти гены в отличие от HCAEC).

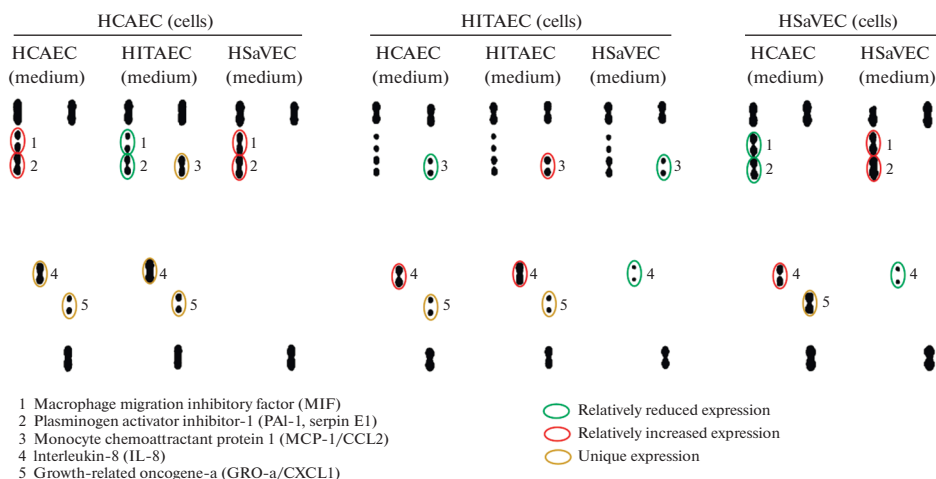


Рис. 2. Сравнительная оценка профиля цитокинов, выделяемых HCAEC (слева), HITAEC (в центре) и HSaVEC (справа), к монослою которых на 24 ч перекрестно добавляли кондиционированную в течение 24 ч среду от монослоя клеток от тех же самых доноров (после центрифугирования при 3000 g для очистки от грубого клеточного дебриса). Культуральная среда из эксперимента по оценке генной экспрессии. Дот-блоттинг (мембраны Proteome Profiler Human Cytokine Array, ARY005B, R&D Systems). Зеленым цветом выделены молекулы с относительно сниженной экспрессией, красным цветом – с относительно повышенной экспрессией, золотым цветом – с уникальной экспрессией.

нии с культуральной средой от HCAEC, к которым добавляли аутологичную кондиционированную среду); 2) отсутствие экспрессии провоспалительных цитокинов MCP1/CCL2, интерлейкина-8 и CXCL1 в культуральной среде от HCAEC, к которым добавляли аутологичную кондиционированную среду от HSaVEC; 3) относительное повышение уровня интерлейкина-8 и уникальную экспрессию CXCL1 в культуральной среде от HITAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от артериальных эндотелиальных клеток (в сравнении с культуральной средой от HITAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HSaVEC); 4) относительное повышение уровня интерлейкина-8 и уникальная экспрессия CXCL1 в культуральной среде от HSaVEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HCAEC (в сравнении с культуральной средой от HSaVEC, к которым добавляли аутологичную кондиционированную среду). Таким образом, кондиционированная среда от артериальных эндотелиальных клеток стимулировала провоспалительный цитокиновый ответ (в частности активное выделение интерлейкина-8 и CXCL1) в сравнении с кондиционированной средой от венозных эндотелиальных клеток, при этом HITAEC также характеризовались повышенным выделением MCP-1/CCL2, а кондиционированная среда от них – способностью индуцировать выделение этого цитокина HCAEC.

Аналогичный анализ профиля про- и анти-ангиогенных молекул (рис. 3) показал: 1) относительное повышение уровня провоспалительного цитокина интерлейкина-6, про-ангиогенного плацентарного фактора роста (PIGF) и про-ангиогенной матрикс-ремоделирующей матриксной металлопротеиназы-1 (MMP-1) в культуральной среде от HCAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от артериальных эндотелиальных клеток (в сравнении с культуральной средой от HCAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HSaVEC); 2) относительное повышение уровня про-ангиогенной молекулы ангиопоэтина-1 (ANGPT1)

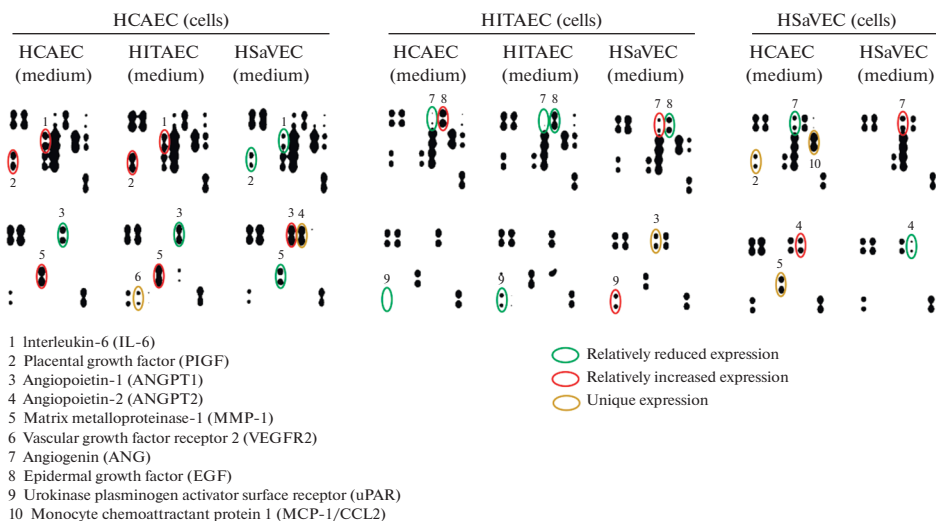


Рис. 3. Сравнительная оценка профиля про- и анти-ангиогенных молекул, выделяемых HCAEC (слева), HITAEC (в центре) и HSAVEC (справа), к монослою которых на 24 ч перекрестно добавляли кондиционированную в течение 24 ч среду от монослоя клеток от тех же самых доноров (после центрифугирования при 3000 g для очистки от грубого клеточного дробиса). Культуральная среда из эксперимента по оценке генной экспрессии. Дот-блоттинг (мембраны Human Angiogenesis Antibody Array – Membrane, ab193655, Abcam). Зеленым цветом выделены молекулы с относительно сниженной экспрессией, красным цветом – с относительно повышенной экспрессией, золотым цветом – с уникальной экспрессией.

в сочетании с уникальной экспрессией анти-ангиогенной молекулы ангиопоэтина-2 (ANGPT2) в культуральной среде от HCAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HSAVEC (в сравнении с культуральной средой от HCAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от артериальных эндотелиальных клеток); 3) относительное повышение уровня про-ангиогенных молекул ангиогенина и рецептора к матрикс-ремоделлирующей урокиназе (uPAR) в культуральной среде от HITAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HSAVEC (в сравнении с культуральной средой от HITAEC, к которым добавляли кондиционированную среду от артериальных эндотелиальных клеток); 4) относительное повышение уровня анти-ангиогенной молекулы ангиопоэтина-2 (ANGPT2) и уникальную экспрессию про-ангиогенного плацентарного фактора роста (PIGF), про-ангиогенной матрикс-ремоделлирующей матриксной металлопротеиназы-1 (MMP-1) и провоспалительной молекулы MCP-1/CCL2 в HSAVEC, к которым добавляли кондиционированную среду от HCAEC (в сравнении с HSAVEC, к которым добавляли аутологичную кондиционированную среду); 5) уникальную экспрессию провоспалительного цитокина интерлейкина-6 в культуральной среде от HCAEC, но не от HITAEC или HSAVEC. Таким образом, кондиционированная среда от артериальных эндотелиальных клеток обладала выраженным про-ангиогенным профилем при воздействии на HCAEC и HSAVEC, но не на HITAEC.

Дальнейший иммуноферментный анализ (рис. 4) обнаружил статистически значимое снижение концентрации провоспалительной молекулы интерлейкина-6 во всех случаях при добавлении кондиционированной среды от HSAVEC, а также в культурах HITAEC и HSAVEC при добавлении кондиционированной среды от HITAEC (однако при этом данная концентрация все равно была выше, чем при добавлении конди-

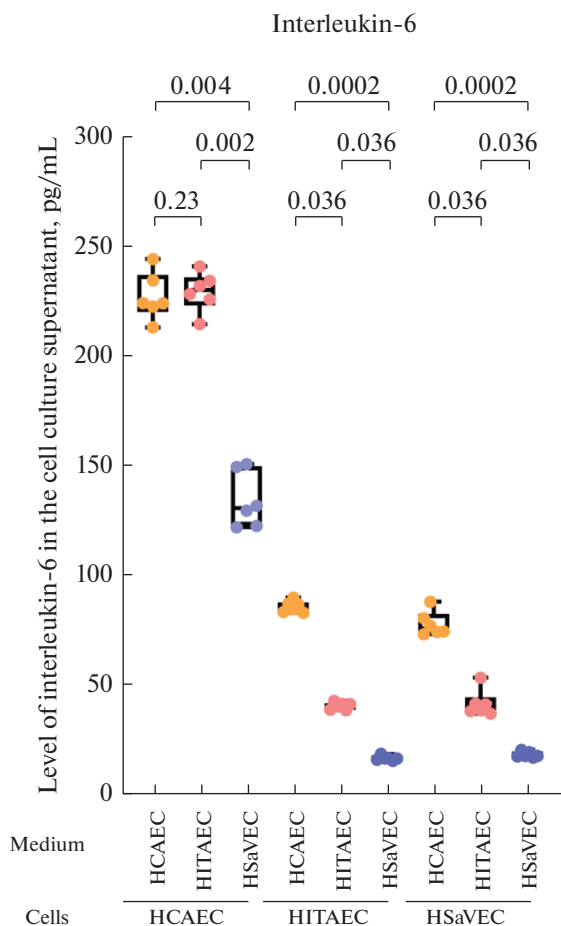


Рис. 4. Иммуноферментный анализ концентрации интерлейкина-6, выделяемого HCAEC (слева), HITAEC (в центре) и HSAVEC (справа), к монослою которых на 24 ч перекрестно добавляли кондиционированную в течение 24 ч среду от монослоя клеток от тех же самых доноров (после центрифугирования при 3000 *g* для очистки от грубого клеточного дебриса). Культуральная среда из эксперимента по оценке генной экспрессии. Иммуноферментный анализ (набор LEGEND MAX, 430507, BioLegend). *n* = 6 повторов на группу. Каждая точка на графиках отражает одно измерение. Оранжевый цвет отражает добавление кондиционированной культуральной среды от HCAEC, розовый – добавление кондиционированной культуральной среды от HITAEC, светло-фиолетовый – добавление кондиционированной культуральной среды от HSAVEC. Критерий Краскела–Уоллиса с последующим попарным U-критерием Манна–Уитни, поправка на множественные сравнения посредством применения средней доли ложных отклонений гипотез (false discovery rate, FDR по Беньямини, Кригеру и Йекутиели), значения *q* (скорректированные с учетом FDR значения *P*) приведены над графиками.

ционированной среды от HSAVEC). На основании полученных данных был сделан вывод о том, что HCAEC выделяют в микроокружение больше интерлейкина-6, чем HITAEC и HSAVEC, при этом их культивирование с кондиционированной средой от HSAVEC существенно снижает активность данного процесса.

Помимо анализа провоспалительного и ангиогенного секреторного профиля артериальных и венозных эндотелиальных клеток, также был проведен анализ экспрессии ими провоспалительных молекул клеточной адгезии (рецепторов эндоте-

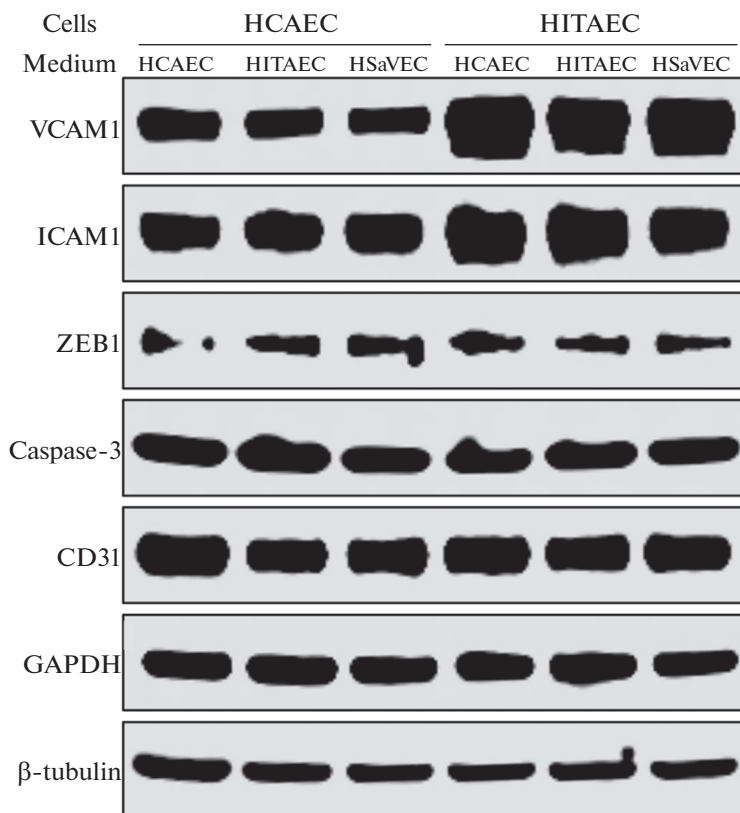


Рис. 5. Сравнительный анализ экспрессии провоспалительных молекул клеточной адгезии (рецепторы эндотелиальных клеток для лейкоцитов VCAM1 и ICAM1), транскрипционного фактора эндотелиально-мезенхимального перехода (ZEB1), центрального апоптотического фермента (каспазы-3) и референсных белков (специфическая эндотелиальная молекула клеточной адгезии CD31, цитозольный фермент глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (GAPDH) и белок цитоскелета бета-тубулин) в HCAEC (слева) и HITaEC (справа), к монослою которых на 24 ч перекрестно добавляли кондиционированную в течение 24 ч среду от монослоя клеток от тех же самых доноров (после центрифугирования при 3000 g для очистки от грубого клеточного дебриса). Иммуноблоттинг (антитела кролика к VCAM1 (ab134047, 1 : 1000, Abcam), ICAM1 (ab109361, 1 : 1000, Abcam), ZEB1 (ab203829, 1 : 200, Abcam), CD31 (ab9498, 1 : 1000, Abcam), антитела мыши к каспазе-3 (ab208161, 1 : 250, Abcam) и глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназе (GAPDH, ab139416, 1 : 250, Abcam), антитела козла к бета-тубулину (ab21057, 1 : 1000, Abcam). Вторичные антитела козла против кролика (7074, Cell Signaling Technology, 1 : 200), козла против мыши (AP130P, Sigma-Aldrich, 1 : 1000) и осла против козла (ab205723, Abcam, 1 : 400), реагент для хемилюминесцентной детекции SuperSignal West Pico PLUS (34580, Thermo Scientific).

лиальных клеток для лейкоцитов VCAM1 и ICAM1), транскрипционного фактора эндотелиально-мезенхимального перехода ZEB1 (поскольку более значимые транскрипционные факторы этого процесса Snail и Slug по неясным причинам не были детектированы в лизате эндотелиальных клеток с данного эксперимента) и центрального апоптотического фермента – каспазы-3 (рис. 5):

Отсутствие видимых различий в экспрессии указанных белков между экспериментальными группами свидетельствовало о том, что кондиционированная среда от артериальных или венозных эндотелиальных клеток при добавлении к артери-

альным эндотелиальным клеткам не вызывает резких изменений уровня провоспалительных молекул клеточной адгезии или выраженной запрограммированной клеточной гибели.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В клинической практике выбор артериального или венозного кондукта для проведения коронарного шунтирования с учетом их структурных и функциональных особенностей играет определяющую роль для последующего клинического исхода (и качества жизни пациента после оперативного вмешательства) [11]. В сценарии гетеротопического функционирования, который сопровождается кардинальными изменениями гемодинамических условий, артериальные и венозные кондуиты могут оказывать совершенно различное влияние на шунтируемую КА [12] в рамках морфофункциональной системы “конduit–артерия”. Концепция системы “конduit–артерия” предлагает рассматривать хирургически соединенные коронарную артерию и артериальные/венозные кондуиты как единую и взаимно регулирующую систему, в основе которой лежат постоянные паракринные взаимодействия между кондуктом (как правило, БПВ или ВГА) и шунтируемой КА, физиологические или патологические эффекты которых определяют риск тромбоза и прогрессирование рестеноза или неоатеросклероза как в пораженной атеросклерозом КА, так и в изначально интактном кондукте [13]. В зависимости от выбора кондуктов формирование системы “конduit–артерия” может происходить в виде создания артерио-артериального и венозно-артериального континуумов. По ранее полученным нашей группой данным, артерио-артериальный континуум является более благоприятным для поддержания коронарного гомеостаза в лучшей интеграции ВГА и КА на уровне эндотелиальных клеток за счет их взаимно благотворных паракринных взаимодействий, в то время как венозно-артериальный континуум между БПВ и КА может препятствовать развитию устойчивости соответствующих сосудов к атеросклерозу и рестенозу [10]. Концепция морфофункциональной системы “конduit–артерия” позволяет рассматривать клинические проявления отдаленных послеоперационных осложнений в патофизиологической связи с природой кондукта, учитывая, что длительность его функционирования существенно различается в зависимости от его принадлежности к артериям или венам. Артериальные кондуиты в целом имеют более высокую долговременную проходимость: для ВГА она к 1-му году после коронарного шунтирования составляет 93–96%, через 5–7 лет – 88–98%, через ≥ 10 лет – 85–95%, для лучевой артерии – 89–92, 90–98, 89–91%, для правой желудочно-сальниковой артерии – 92–97, 80–90 и 62%, в то время как для БПВ – 81–98, 75–86 и 50–60% соответственно [14]. Причиной такого превосходства артерио-артериального континуума над венозно-артериальным может являться повышенное выделение ВГА атеропротективных молекул (NO и простаглицина), препятствующих прогрессированию коронарного атеросклероза [15]. Сочетание благоприятных гистологических характеристик и атеропротективного физиологического профиля обеспечивает функциональную состоятельность артерио-артериального континуума даже в отдаленном периоде [13, 16], в то время как до 50% венозных кондуктов в рамках венозно-артериального континуума теряют свою проходимость в первые 5 лет [17]. Тем не менее, несмотря на общую устойчивость к липидной и воспалительной инфильтрации, у определенной доли пациентов артериальные кондуиты (в том числе ВГА) не справляются со своей задачей, вероятно, вследствие нарушенной регуляции функционирования сосудистых гладкомышечных клеток и их гиперпролиферации, возникающей вследствие их перехода с сократительного фенотипа на синтетический и являющейся субстратом для прогрессирования гипертрофии интимы [18]. Следует отметить, что различные патофизиологические сце-

нарии не всегда тождественны неблагоприятным клиническим исходам. К примеру, сохранение нативного кровоснабжения коронарной артерии часто приводит к нарушению функционирования шунта, не приводящему к развитию клинических симптомов, а окклюзия кондуита ассоциирована с нелетальными неблагоприятными исходами, в отличие от повторной окклюзии коронарной артерии, которая достаточно часто заканчивается смертью пациента [19].

Атерогенный и атеропротективный сценарии в морфофункциональной системе “конduit–артерия” в значительной степени управляются ангиокринными свойствами эндотелиальных клеток коронарной артерии и кондуитов, которые секретируют огромное количество биоактивных факторов и показывают высокую степень гетерогенности как в зависимости от направления дифференцировки кровеносных сосудов (артерии или вены), так и от их локализации внутри артериального русла (к примеру, КА и ВГА) [20]. В частности, НТАЕС (эндотелиальные клетки ВГА) характеризуются повышенной экспрессией эндотелиальной синтазы монооксида азота eNOS [21] и самого монооксида азота (NO), являющегося одним из ключевых вазодилататоров, в ответ на воздействие сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) [22]. Кроме этого, НТАЕС также отличаются от HsAVEC (эндотелиальные клетки БПВ) повышенным уровнем циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), опосредующего вазодилатирующий эффект NO, простаглицлина (простаглицлина I2) и эндотелий-зависимого гиперполяризующего фактора (EDHF) [23]. Такое многообразие вазоактивных факторов со стороны эндотелиальных клеток ВГА может приводить к различным паракринным эффектам, сопровождающимся гомеостатическими изменениями баланса про- и анти-ангиогенных молекул и про- и противовоспалительных цитокинов, в конечном счете способствуя физиологическому функционированию морфофункциональной системы “конduit–артерия” в рамках артерио-артериального континуума. Одно из последних исследований показало, что в сравнении с БПВ, ВГА отличаются менее выраженным сократительным ответом на воздействие различных вазоконстрикторов (простаглицлинов E2 и F2 α , фенилэфрина, лейкотриенов C4 и D, хлорида калия и арахидоновой кислоты), однако при этом характеризуются более выраженной ацетилхолин-индуцированной вазорелаксацией [24]. Следует отметить отсутствие ясного понимания того, какие именно цитокины или метаболиты могут способствовать развитию вышеупомянутых атерогенного и атеропротективного сценариев. Для ответа на этот вопрос следовало бы провести протеомное профилирование совокупности выделяемых эндотелиальных клеток в микроокружение молекул (секретома) при помощи жидкостной хроматографии, совмещенной с тандемной масс-спектрометрией, однако данный подход является достаточно сложным и дорогим. С этой целью предпочтительным подходом для изначального анализа является скрининговое полуколичественное исследование при помощи дот-блоттинга (позволяющее определять содержание определенных функциональных классов молекул, к примеру, про- и противовоспалительных или про- и антиангиогенных) с последующей верификацией дифференциально экспрессированных молекул при помощи количественного иммуноферментного анализа.

В данном исследовании было проведено *in vitro* моделирование взаимодействий между эндотелиальными клетками кондуитов (НТАЕС и HsAVEC) и эндотелиальными клетками КА (HCAEC) в контексте имитации артерио-артериального и венозно-артериального континуумов системы “конduit–артерия”. Для этой цели было произведено перекрестное добавление кондиционированной среды к интактному монослою соответствующих эндотелиальных клеток с последующим измерением экспрессии ключевых эндотелиальных генов и белков, включая некоторые секретируемые ими факторы, с целью определения изолированного (в отличие от ранее примененной модели прямого сокультивирования [10]) влияния артери-

альных и венозных эндотелиальных клеток друг на друга. Результаты были проанализированы при помощи профилирования генной экспрессии (используя оригинальную панель генов для определения дисфункции эндотелия) методом ОТ-кПЦР, классического иммуноблоттинга, а также дот-блоттинга и иммуноферментного анализа секретируемых эндотелиальных клеток в микроокружение молекул в соответствии с указанным выше методологическим подходом.

Проведенные эксперименты позволили сделать следующие выводы:

Анализ генной экспрессии показал, что добавление культуральной среды от НТАЕС снижало выраженность стимулирующего клеточную адгезию провоспалительного ответа в НСАЕС, в то время как добавление культуральной среды от HСаVEC, напротив, активировало транскрипцию в НСАЕС генов провоспалительных цитокинов. В свою очередь, добавление культуральной среды от НСАЕС способствовало поддержанию эндотелиального фенотипа НТАЕС. Кондиционированная среда от артериальных эндотелиальных клеток стимулировала выделение про-ангиогенных молекул при воздействии на НСАЕС и HСаVEC, но не НТАЕС. Добавление кондиционированной среды от HСаVEC приводило к статистически значимому снижению концентрации интерлейкина-6 во всех трех сценариях.

1. Взаимодействие артериальных эндотелиальных клеток в модели НТАЕС (среда)–НСАЕС (клетки) препятствует их провоспалительной активации на уровне транскрипции рецепторов эндотелиальных клеток к лейкоцитам (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SELP*) и генов провоспалительных цитокинов (*CXCL8*, *CCL2*, *CXCL1*) и поддерживает эндотелиальный фенотип НТАЕС, снижая транскрипцию генов транскрипционных факторов эндотелиально-мезенхимального перехода (*SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*);

2. Артериальные эндотелиальные клетки обладают выраженной про-ангиогенной активностью в моделях НТАЕС (среда)–НСАЕС (клетки) и НСАЕС (среда)–HСаVEC (клетки);

3. Венозные эндотелиальные клетки (HСаVEC) могут обладать противовоспалительным потенциалом в отношении подавления транскрипции гена *IL6* и снижения выделения кодируемого им провоспалительного цитокина интерлейкина-6 в микроокружение, что может иметь патофизиологическую значимость, учитывая повышенный базовый уровень выделения интерлейкина-6 НСАЕС в сравнении с НТАЕС и HСаVEC.

Таким образом, проведенные в данной работе эксперименты позволили предоставить патофизиологическое обоснование функциональных последствий взаимодействия эндотелиальных клеток КА (НСАЕС), эндотелиальных клеток ВГА (НТАЕС) и эндотелиальных клеток БПВ (HСаVEC) в рамках концепции морфофункциональной системы “конduit–артерия”. Следует отметить, что полученные результаты частично проливают свет на паракринные эффекты эндотелиальных клеток в рамках как артерио-артериального, так и венозно-артериального континуума (в частности, подчеркивая вероятный противовоспалительный потенциал HСаVEC). Клиническая релевантность проведенного исследования заключается в наличии соответствующего хирургического сценария множественного коронарного шунтирования, при котором КА с окклюзионно-стенотическим поражением соединяется с кондуитом (шунтом), в качестве которого выступает ВГА или БПВ, получая таким образом кровь из артериального бассейна (аорта или подключичная артерия). В госпитальном периоде, как правило, венозные кондуиты по эффективности не уступают артериальным (поскольку их забор и манипуляции с ними при выполнении оперативного вмешательства существенно проще и сопряжены с меньшим риском развития инфекционных осложнений), однако в отдаленном периоде артериальное шунтирование имеет свои преимущества вследствие большей

устойчивости артериальных кондуитов к атеросклерозу, тромбозу и рестенозу в гетеротопической позиции.

Проведенные в ходе данного проекта патофизиологические изыскания не позволяют сделать однозначного вывода в пользу фундаментального обоснования выбора того или иного шунта, поскольку паракринные взаимодействия между артериальными эндотелиальными клетками более благоприятны в отношении регенеративного ангиогенеза и поддержания артериального эндотелиального фенотипа, а венозные эндотелиальные клетки могут паракринно снижать провоспалительную активацию артериального эндотелия за счет меньшего выделения провоспалительных цитокинов. Вероятно, дальнейшая расшифровка патофизиологических сценариев, происходящих внутри артерио-артериального и венозно-артериального континуума морфофункциональной системы “кондуит–артерия”, требует протеомного профилирования (в первую очередь секрета эндотелиальных клеток, то есть совокупности выделяемых ими в микроокружение молекул) при помощи масс-спектрометрических подходов с последующей верификацией дифференциально экспрессированных молекул посредством иммуноферментного анализа.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2021-001 “Разработка новых фармакологических подходов к экспериментальной терапии атеросклероза и комплексных цифровых решений на основе искусственного интеллекта для автоматизированной диагностики патологий системы кровообращения и определения риска летального исхода” при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках национального проекта “Наука и университеты”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – А.В.Ф., А.Г.К., Е.В.Г., проведение экспериментов – Д.К.Ш., В.Е.М., М.Ю.С., А.В.С., А.О.П., А.Ю.К., обработка данных – А.Г.К., анализ литературных данных – А.Ю.К., В.Е.М., А.О.П., Н.И.З., написание статьи – А.В.Ф., В.Е.М., А.Ю.К., А.Г.К.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *dela Paz NG, D'Amore PA* (2009) Arterial versus venous endothelial cells. *Cell Tissue Res* 335(1): 5–16.
<https://doi.org/10.1007/s00441-008-0706-5>
2. *Rafii S, Butler JM, Ding BS* (2016) Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. *Nature* 529(7586): 316–325.
<https://doi.org/10.1038/nature17040>
3. *Verrier ED, Boyle EM Jr* (1996) Endothelial cell injury in cardiovascular surgery. *The Ann Thorac Surg* 62(3): 915–922.
[https://doi.org/10.1016/s0003-4975\(96\)00528-0](https://doi.org/10.1016/s0003-4975(96)00528-0)
4. *Augustin HG, Koh GY* (2017) Organotypic vasculature: From descriptive heterogeneity to functional pathophysiology. *Science (New York)* 357(6353): eaal2379.
<https://doi.org/10.1126/science.aal2379>
5. *Zeff RH, Kongthaworn C, Iannone LA, Gordon DF, Brown TM, Phillips SJ, Skinner JR, Spector M* (1988) Internal mammary artery versus saphenous vein graft to the left anterior descending coronary artery: prospective randomized study with 10-year follow-up. *Ann Thorac Surg* 45(5): 533–536.
[https://doi.org/10.1016/s0003-4975\(10\)64526-2](https://doi.org/10.1016/s0003-4975(10)64526-2)

6. Ray FR, Huang W, Slater M, Barden JA (2002) Purinergic receptor distribution in endothelial cells in blood vessels: a basis for selection of coronary artery grafts. *Atherosclerosis* 162(1): 55–61. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(01\)00681-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(01)00681-5)
7. Wadey K, Lopes J, Bendeck M, George S (2018) Role of smooth muscle cells in coronary artery bypass grafting failure. *Cardiovasc Res* 114(4): 601–610. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy021>
8. Hadinata IE, Hayward PA, Hare DL, Matalanis GS, Seevanayagam S, Rosalion A, Buxton BF (2009) Choice of conduit for the right coronary system: 8-year analysis of Radial Artery Patency and Clinical Outcomes trial. *Ann Thorac Surg* 88(5): 1404–1409. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2009.06.010>
9. Lytle BW, Loop FD, Cosgrove DM, Ratliff NB, Easley K, Taylor PC (1985) Long-term (5 to 12 years) serial studies of internal mammary artery and saphenous vein coronary bypass grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 89(2): 248–258.
10. Shishkova D, Markova V, Sinitsky M, Tsepokina A, Frolov A, Zagorodnikov N, Bogdanov L, Kutiikhin A (2020) Co-Culture of Primary Human Coronary Artery and Internal Thoracic Artery Endothelial Cells Results in Mutually Beneficial Paracrine Interactions. *Int J Mol Sci* 21(21): 8032. <https://doi.org/10.3390/ijms21218032>
11. Dimeling G, Bakaeen L, Khatri J, Bakaeen FG (2021) CABG: When, why, and how? *Cleve Clin J Med* 88(5): 295–303. <https://doi.org/10.3949/ccjm.88a.20115>
12. Alizadehghobadi S, Biglari H, Niroomand-Oscuii H, Matin MH (2021) Numerical study of hemodynamics in a complete coronary bypass with venous and arterial grafts and different degrees of stenosis. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 24(8): 883–896. <https://doi.org/10.1080/10255842.2020.1857744>
13. Фролов АВ (2019) Морфофункциональная система “конduit-артерия”. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний 8(1): 112–122. [Frolov AV (2019) Morphological and functional system of graft-artery junctions. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases* 8(1): 112–122. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2019-8-1-112-122>
14. Gaudino M, Antoniadis C, Benedetto U, Deb S, Di Franco A, Di Giammarco G, Fremes S, Glineur D, Grau J, He GW, Marinelli D, Ohmes LB, Patrono C, Puskas J, Tranbaugh R, Girardi LN, Taggart DP, ATLANTIC (Arterial Grafting International Consortium) Alliance (2017) Mechanisms, Consequences, and Prevention of Coronary Graft Failure. *Circulation* 136(18): 1749–1764. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027597>
15. Kitamura S (2011) Physiological and metabolic effects of grafts in coronary artery bypass surgery. *Circ J* 75(4): 766–772. <https://doi.org/10.1253/circj.cj-10-1302>
16. Carrel T, Winkler B (2017) Current trends in selection of conduits for coronary artery bypass grafting. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 65(10): 549–556. <https://doi.org/10.1007/s11748-017-0807-8>
17. Калинин РЕ, Сучков ИА, Пиенников АС, Виноградов СА (2019) Маркеры артериовенозной дифференцировки эндотелиальных клеток и их влияние на адаптацию аутовенозных кондуитов в реконструктивной хирургии магистральных артерий. *Новости хирургии* 27(1):91–100. [Kalinin RE, Suchkov IA, Pshennikov AS, Vinogradov SA (2019) Markers of arteriovenous differentiation of endothelial cells and their influence on adaptation of autovenous conduits in main arteries reconstructive surgery. *Surgery News* 27(1): 91–100. (In Russ)]. <https://doi.org/10.18484/2305-0047.2019.1.91>
18. Malinska A, Podemska Z, Sujka-Kordowska P, Witkiewicz W, Nowicki M, Perek B, Witt M (2017) Caveolin 2: a facultative marker of unfavourable prognosis in long-term patency rate of internal thoracic artery grafts used in coronary artery bypass grafting. Preliminary report. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 24(5): 714–720. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivw411>
19. Gaudino M, Di Franco A, Bhatt DL, Alexander JH, Abbate A, Azzalini L, Sandner S, Sharma G, Rao SV, Crea F, Fremes SE, Bangalore S (2021) The association between coronary graft patency and clinical status in patients with coronary artery disease. *Eur Heart J* 42(14): 1433–1441. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab096>
20. Spadaccio C, Antoniadis C, Nenna A, Chung C, Will R, Chello M, Gaudino M (2020) Preventing treatment failures in coronary artery disease: what can we learn from the biology of in-stent restenosis, vein graft failure, and internal thoracic arteries? *Cardiovasc Res* 116(3): 505–519. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz214>
21. Gaudino M, Toesca A, Maggiano N, Pragliola C, Possati G (2003) Localization of nitric oxide synthase type III in the internal thoracic and radial arteries and the great saphenous vein: a comparative immunohistochemical study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 125(6): 1510–1515. [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(03\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(03)00029-1)

22. Broeders MA, Doevendans PA, Maessen JG, van Gorsel E, Egbrink MG, Daemen MJ, Tangelder GJ, Reneman RS, van der Zee R (2001) The human internal thoracic artery releases more nitric oxide in response to vascular endothelial growth factor than the human saphenous vein. *J Thorac Cardiovasc Surg* 122(2): 305–309.
<https://doi.org/10.1067/mtc.2001.113602>
23. Tadjkarimi S, O'Neil GS, Luu TN, Allen SP, Schyns CJ, Chester AH, Yacoub MH (1992) Comparison of cyclic GMP in human internal mammary artery and saphenous vein: implications for coronary artery bypass graft patency. *Cardiovasc Res* 26(3): 297–300.
24. Ozen G, Aljesri K, Turkyilmaz G, Turkyilmaz S, Kavala AA, Topal G, Norel X (2022) Comparative study of coronary artery bypass graft materials: reduced contraction and ADMA levels in internal mammary artery versus saphenous vein. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 63(1): 69–77.
<https://doi.org/10.23736/S0021-9509.21.11796-3>

Paracrine Effects of Conditioned Medium during Its Cross-Addition to Arterial and Venous Endothelial Cells

A. V. Frolov^a, D. K. Shishkova^a, V. E. Markova^a, *, M. Yu. Sinitsky^a,
A. V. Sinitskaya^a, A. O. Poddubnyak^a, A. Yu. Kanonykina^a,
N. I. Zagorodnikov^a, E. V. Grigoriev^a, and A. G. Kutikhin^a

^aResearch Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

*e-mail: markve97@gmail.com

Endothelial dysfunction is among the major triggers of cardiovascular disease, also promoting thrombosis, restenosis, and neoatherosclerosis within the conduit and coronary artery upon the coronary artery bypass graft surgery. To recapitulate the paracrine interactions between arterial and venous endothelial cells (ECs) by cross-addition of the conditioned medium to the respective cell cultures. Conditioned (24 h) serum-free medium from confluent primary human coronary artery ECs (HCAEC), primary human internal thoracic artery ECs (HITAEC) and primary human saphenous vein ECs (HSaVEC) was added to a confluent monolayer of intact HCAEC, HITAEC, and HSaVEC for another 24 h. Cellular response has been assessed by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction, Western blotting and enzyme-linked immunosorbent assay. Gene expression analysis showed that HITAEC-conditioned medium ameliorated inflammatory response in HCAEC, in contrast to HSaVEC-conditioned medium. In turn, HCAEC-conditioned medium maintained the endothelial phenotype of HITAEC. Further, HCAEC- and HITAEC-conditioned medium stimulated release of pro-angiogenic molecules by intact HCAEC and HSaVEC cultures. HSaVEC-conditioned medium notably reduced the secretion of pro-inflammatory cytokine interleukin-6 in all cell cultures. Conclusions: Paracrine interactions between HITAEC and HCAEC govern their anti-inflammatory status and enhance HCAEC angiogenic potential, partially explaining the higher primary patency of arterial conduits and resistance of coronary artery to thrombosis, restenosis and neoatherosclerosis in the long-term period after total arterial revascularisation.

Keywords: endothelial cells, coronary artery bypass graft surgery, paracrine effects, conditioned medium, coronary artery, saphenous vein, internal thoracic artery