

ЭНДОТЕЛИЙ *IN VIVO* И *IN VITRO*. ЧАСТЬ 2: ОСОБЕННОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ С ЭНДОТЕЛИОЦИТАМИ

© Н.Д. Мжаванадзе, Н.В. Короткова, Е.А. Стрельникова, И.Ю. Суров, П.Ю. Иванова, А.Д. Боженова

Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Рязань, российская Федерация

В 2019 году в журнале «Наука молодых» (*Eruditio Juvenium*) коллективом авторов была опубликована первая часть статьи, посвященная ключевым аспектам гистогенеза, особенностям структуры, цитофизиологии и иммуноцитохимическим маркерам эндотелиоцитов (doi:10.23888/HMJ201973450-465). Вторая часть рассказывает об основных клеточных линиях эндотелия, которые используются в лабораторной работе, особенностям 2D и 3D культивирования эндотелиальных клеток. Помимо этого, освещены реалии и перспективы научно-исследовательской работы с эндотелиоцитами, получаемыми из эмбриональных стволовых и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Прижизненное наблюдение за эндотелиоцитами, оценка их морфологии и функции сопровождаются существенными техническими сложностями, что обуславливает необходимость использования методик *in vitro* с целью изучения как патогенеза, так и потенциальных методов лечения различных заболеваний, ассоциированных с нарушением эндотелиальной функции. *In vitro* исследования позволяют оценивать широкий ряд физиологических и патологических процессов на первичной культуре клеток или постоянной клеточной линии при помощи миниатюрных и зачастую автоматизированных моделей и тест-систем, что обладает определенными преимуществами по сравнению с клиническими исследованиями или экспериментами на животных. *In vitro* методики имеют ограничения, главным из которых является сложность сопоставления результатов изучения патологических состояний в рамках лабораторной работы и оценки биологии целого организма. Чрезвычайно важным является постоянное совершенствование *in vitro* методик работы с эндотелиальными клетками различного происхождения, ко-культурами, системами 3D-культивирования, индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками. Понимание особенностей работы с культурами эндотелиоцитов в лабораторных условиях и потенциала оптимизации имеющихся методик позволит разрабатывать и применять последовательные надежные процедуры экстраполяции результатов *in vitro* исследований в условия *in vivo*.

Ключевые слова: эндотелиоциты; 3D культивирование; *in vitro*; ЭСК; ИПСК.

ENDOTHELIUM *IN VIVO* AND *IN VITRO*. PART 2: FEATURES AND PERSPECTIVES OF LABORATORY WORK WITH ENDOTHELIAL CELLS

N.D. Mzhavanadze, N.V. Korotkova, E.A. Strelnikova, I.Yu. Surov, P.Yu. Ivanova, A.D. Bozhenova

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation



In 2019 the authors of this article published the first part of the manuscript dedicated to the key aspects of histogenesis, structure, cytophysiology, and immunocytochemical markers of endothelial cells (doi:10.23888/HMJ201973450-465). The second part of the article aims at delivering state-of-the-art information of the basics of laboratory work with endothelial cells, including main endothelial cell culture lines for *in vitro* experiments, 2D and 3D cultivation of endothelial cells. The authors also discuss current issues and perspectives of laboratory research work involving endothelial cells, derived from embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *In vivo* study of endothelial cells and assessment of their morphology and function are associated with substantial technical difficulties, which necessitates the use of *in vitro* techniques aimed at evaluating pathogenesis and potential treatment methods of a number of diseases associated with endothelial dysfunction. Laboratory work involving cell cultures allows studying both physiological and pathological conditions using miniature and often automated systems, which has several considerable benefits over clinical trials and experiments carried out on animals. *In vitro* techniques have certain limitations, among which are the difficulties in interpreting the results of a work performed on a cell line and comparing those to *in vivo* conditions. Constant improvement of laboratory methods involving different endothelial cell lines, co-cultures, 3D cultivation systems, and induced pluripotent stem cells, is crucial. Understanding the principles of *in vitro* work with endothelial cell cultures and optimization of the current techniques will lead to the development and implementation of the accurate laboratory methods, which will help translate research into practice.

Keyword: *endothelial cells; 3D cultivation; in vitro; ESC; iPSC.*

Развитие и прогрессирование сердечно-сосудистых заболеваний, таких как атеросклероз, артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, острые и хронические заболевания вен, большинство исследователей связывают с нарушением функции сосудистого эндотелия [1,2]. Сложности прижизненного анализа и наблюдения за эндотелиоцитами внутри организма диктуют необходимость создавать модельные системы *in vitro* на основе различных эндотелиальных клеточных линий для изучения патогенеза заболеваний, ассоциированных с эндотелиальной дисфункцией, и находить пути решения данной проблемы.

Положительные аспекты *in vitro* исследований в медицине в целом и в сосудистой биологии в частности не вызывают сомнений: отдельные физиологические или патологические процессы могут быть изучены без влияния сложных межклеточных реакций, либо учета существенных различий между течением заболеваний у человека и их моделированием на экспериментальных животных. Методы *in vitro* могут быть миниатюрными и автоматизированными, характеризоваться относительно небольшой стоимостью про-

водимых экспериментов по сравнению с экспериментами на животных.

Основные клеточные линии, используемые для изучения эндотелия в экспериментах in vitro

Сосудистая система представляет собой сложную сеть, позволяющую приспосабливаться к различным условиям гемодинамики и кровотока, давления, строения органов. Широкая вариабельность сосудов, обусловленная особенностями гемодинамики, окружения и эмбрионального происхождения, приводит к высокому морфологическому и функциональному разнообразию эндотелиальных клеток на всем протяжении сосудистого русла [3]. *In vitro* исследования позволяют изучать роль эндотелиальных клеток в гемостазе, миграции лейкоцитов, воспалении, заживлении ран, метастазировании опухолей, а также ряде других ключевых процессах в физиологических и патологических условиях. Источники эндотелиоцитов для лабораторной работы разнообразны: донорами клеток могут быть как человек, так и животные. Эндотелиальные клетки выделяют из множества сосудов, таких как пупочные артерия и вена, аорта, коронарные артерии, ле-

гочные и подвздошные артерии, большая подкожная вена, а также органов и тканей, включая кожу, легкие, кишечник, миокард и др. [4,5]. Помимо этого, большой интерес для изучения представляют собой эндотелиальные прогениторные клетки и клетки-предшественники, получаемые из периферической крови.

В соответствии с целью планируемого исследования проводится подбор клеточных культур с определенными свойствами. Эндотелий крупных сосудов, макрососудистый, является предпочтительной моделью для изучения ангиогенеза, рака, атеросклероза, тканевой инженерии, тогда как микрососудистые эндотелиальные клетки чаще используются для изучения барьерной функции сосудов, доставки лекарств, иммунных реакций, сердечно-сосудистых заболеваний [6-11]. Следует отметить, что в экспериментах *in vitro* возможно использование двух типов клеточных линий: 1) первичные линии, способные к ограниченному числу пассажей; 2) «иммортиализованные» линии, обладающие стабильным фенотипом в течение неограниченного числа клеточных делений.

Одними из наиболее часто используемых линий являются эндотелиальные клетки пупочной вены человека (англ. *human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) [12,13]. Клеточная линия HUVEC имеет ряд преимуществ: достаточно простые методы выделения и легкое культивирование, а также их относительно низкая стоимость [14]. Помимо HUVEC, в экспериментах *in vitro* используются клетки и других линий, такие как эндотелиальные клетки артерий человека (англ. *human arterial endothelial cells*, HUAEC), клетки эндотелия капилляров кожи человека (англ. *human dermal microvascular endothelial cells*, HMVEC), клетки эндотелия микрососудов легких человека (англ. *human pulmonary microvascular endothelial cells*, HPMEC), эндотелиальные клетки большой подкожной вены человека (англ. *human saphenous vein endothelial cells*, HSVEC). Клетки этих линий используются для создания экспериментальных моде-

лей в изучении сердечно-сосудистых заболеваний, включая расстройства, связанные с атеросклерозом, сахарным диабетом и пр., позволяют изучить механизмы эндотелиальной дисфункции (ЭД), связанной с условиями окружающей среды, оксидативным стрессом, гипоксией, воспалением и другими неблагоприятными условиями [15]. Несмотря на все преимущества вышеуказанных клеточных линий, в первую очередь, HUVEC, и у них есть свои ограничения в экспериментальных исследованиях. Так, большинство патофизиологических событий происходит на уровне микрососудистого русла. Поиски успешной модели для изучения процессов, протекающих в микрососудах, привели к получению клеточной линии человеческого микрососудистого эндотелия HMEC-1 (англ. *human microvascular endothelial cells*). Эти клетки сложно получить в чистой культуре, они требовательны к условиям роста *in vitro* и имеют ограниченную продолжительность жизни. Для устранения этих трудностей проводят иммортализацию первичной культуры, что позволяет получить постоянную клеточную линию с устойчивым фенотипом и менее требовательную к условиям культивирования [16].

С целью выделения и культивирования эндотелиальных клеток используются артерии, вены и периферическая кровь не только человека, но и животных. Например, клетки эндотелия аорты собаки (англ. *canine aortic endothelial cells*, CnAOEC) используются для создания *in vitro* моделей для изучения сердечно-сосудистых заболеваний, причем не только для исследований в области ветеринарии, но и для изучения отдельных механизмов клеточной физиологии и патофизиологии у человека. Так, Wills T.B., et al. (2009) исследовали возможность использования стандартного протокола иммуномагнитной изоляции для количественного определения субпопуляции циркулирующих эндотелиальных клеток – биомаркера повреждения сосудов, и эндотелиальных клеток-предшественников. В исследовании показано, что количество циркулирующих эн-

дотелиальных клеток может коррелировать с плазменными маркерами активации эндотелиальных клеток, таких как фактор фон Виллебранда, тромбомодулин, тканевой фактор и растворимый Е-селектин [17]. Другим примером использования клеточных линий, полученных от животных, являются клетки эндотелия аорты крысы (англ. *rat aortic endothelial cells*, RAOEC), которые могут применяться в *in vitro* изучении эндотелиальной дисфункции [18,19]. Клетки эндотелия капилляров мозга быка (англ. *bovine brain microvascular endothelial cells*, BVMVEC) используются в качестве модельных систем для изучения отдельных эндотелиальных факторов в патогенезе сложных системных заболеваний. Так, Mathew J., et al. (2014) изучали действие фактора роста фибробластов FGF-2 эндотелиоцитов на изменённые внеклеточные белки, в частности, гликированный коллаген и β -амилоидный белок, при сахарном диабете и болезни Альцгеймера. Были отмечены изменения в плазминогеновой системе, связанные с повышением ингибитора активатора плазминогена-1 и усиленным специфическим связыванием витронектина с его рецептором-субъединицей β интегрин $\alpha v \beta 5$. Авторы показали, что дисфункция эндотелиальных клеток, особенно в процессе ангиогенеза, может способствовать развитию вышеуказанных заболеваний [20]. Эндотелиоциты, полученные от свиней, также широко используются в лабораторных исследованиях, например, в оценке клеточной адгезии и биосовместимости *in vitro* при изучении тканеинженерных сосудистых протезов [21].

Все вышеперечисленные клеточные эндотелиальные линии, как человеческого, так и животного происхождения активно используются в рутинной научно-исследовательской работе *in vitro*.

Особенности культивирования эндотелиоцитов в 2D условиях

Существуют общепринятые протоколы выделения и 2D культивирования эндотелиоцитов в монослое, которые могут быть видоизменены исследователями

в зависимости от целей, задач и условий проведения эксперимента [22].

На данный момент имеется широкий выбор культуральных сред, которые существенно различаются по составу добавок. В то время как некоторые среды дополнены отдельными рекомбинантными факторами роста, такими как EGF (эпидермальный фактор роста, англ. *epidermal growth factor*), FGF2 (фактор роста фибробластов 2, англ. *fibroblast growth factor 2*), VEGF (сосудистый эндотелиальный фактор роста, англ. *vascular endothelial growth factor*) и IGF1 (инсулиноподобный фактор роста 1, англ. *insulin-like growth factor 1*), другие среды содержат комбинированные добавки ECGS (добавка для роста эндотелиальных клеток, англ. *endothelial cell growth supplement*), которые производятся из бычьего мозга – BBE (экстракт бычьего мозга, англ. *bovine brain extract*), гипофиза – BPE (экстракт бычьего гипофиза, англ. *bovine pituitary extract*) или гипоталамуса – BHE (экстракт бычьего гипоталамуса, англ. *bovine hypothalamus extract*), богатые веществами, способствующими росту и пролиферации эндотелиоцитов. Помимо факторов роста, среда для культивирования эндотелиальных клеток может быть дополнена гидрокортизоном, может содержать L-глутамин, гепарин, аскорбиновую кислоту и циклический аденозинмонофосфат (АМФ). Поскольку рост, пролиферация, жизнеспособность и дифференцировка эндотелиальных клеток регулируются эндокринными факторами, все перечисленные процессы могут модулироваться питательными средами и добавками [23,24]. *In vivo* пролиферация клеток ограничена эмбриональным и плацентарным развитием, а также некоторыми процессами, протекающими во взрослом организме. Для эндотелиоцитов основным состоянием является пресинтетическая G0 фаза клеточного деления или состояние покоя. Следовательно, во время культивирования *in vitro* в питательной среде должны содержаться вещества, стимулирующие пролиферацию – ростовые факторы.

Примером работы с эндотелиоцитами в рутинной лабораторной работе может служить культивирование клеток, как артериального, так и венозного происхождения, в плотности не менее 10^4 кл/см² в ростовой среде (например, DMEM/F12 (среда Игла в модификации Дульбекко с добавлением питательных веществ (F-12), англ. *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*) – или 199) с добавлением L-глутамина, 1% пенициллина/стрептомицина, NERES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота, англ. (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-

ethanesulfonic acid), NaHCO₃, факторов роста VEGF, EGF, bFGF, гепарина и эмбриональной (фетальной) телячьей сыворотки. В своей ежедневной лабораторной работе мы, как правило, используем следующую ростовую среду для работы с эндотелиоцитами как венозного, так и артериального происхождения до достижения искомой конfluence (70-80%): среда DMEM/F12, 10% фетальная бычья сыворотка, пенициллин-стрептомицин 100 мг/мл, факторы роста VEGF 3 нг/мл, EGF 0.4 нг/мл, FGF 10 нг/мл, 1% раствор GlutaMax (рис. 1).

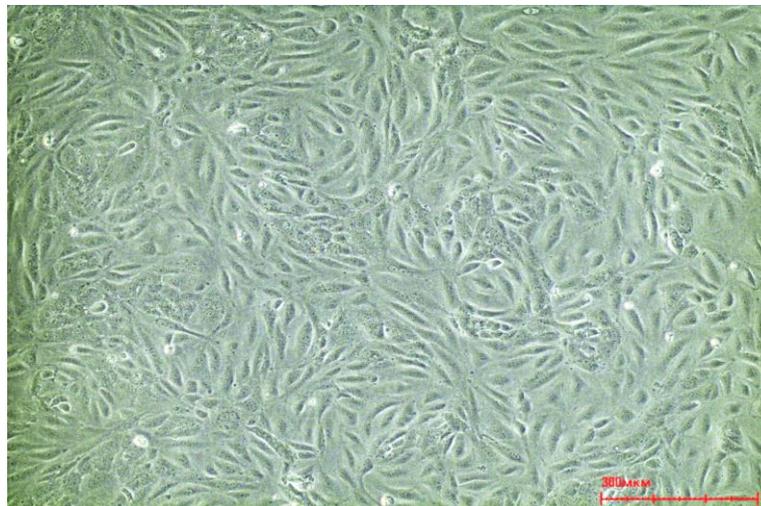


Рис. 1. Пример 2 D культивирования. Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) в двумерной монослойной культуре *in vitro*. Ув. $\times 200$.
Лаборатория клеточных технологий ЦНИЛ

Удобной альтернативой для рутинной работы могут служить готовые ростовые среды для эндотелия, такие как ECGM (англ. *Endothelial Cell Growth Medium, Cell Applications*), либо добавки к базовой среде в виде бычьего питуитального экстракта ВРЕ. Процедуру замены среды осуществляют раз в одни-два суток, культуры пассируют с использованием 0,25% раствора трипсина в плотности 100 тыс. кл./см². Помимо факторов роста, таких как VEGF, FGF, EGF, условий атмосферы, субстрата и т.д. большое значение для роста клеток в культуре имеет микрорельеф культуральной поверхности, а также тип и плотность лигандов, участвующих в образовании фокальных адгезий. В

условиях *in vitro* соотношение клеточных контактов, которое в организме определяется внеклеточным матриксом и субстратом, при 2D культивировании в монослое нарушается, что в итоге приводит к изменению морфологии и функциональных характеристик большинства клеточных культур, в том числе и эндотелия [25].

Особенности культивирования эндотелиоцитов в 3D условиях

Поскольку межклеточные взаимодействия играют решающую роль в регуляции клеточной физиологии, в попытках воссоздать наиболее оптимальные условия роста, дифференцировки, пролиферации и адгезии клеток были исследованы

различные компоненты межклеточного матрикса. Для этого эндотелиоциты высевали в стандартные колбы для тканевых культур или на коллаген I типа, фибронектин, ламинин, и выращивали в среде с низким содержанием сыворотки, содержащей различные факторы роста, включая bFGF, EGF или ECGS. Клетки, выращенные на коллагене I типа в течение пяти-семи дней, показали увеличение числа клеток в два-четыре раза по сравнению с клетками, посеянными на пластик, ламинин или фибронектин. Митогенный эффект коллагена I был максимальным, когда EGF, ECGS и гепарин были включены в оптимизированную среду с низким содержанием сыворотки. Однако для индукции дифференцировки оптимальными внеклеточными матрицами ECM (англ. *extracellular matrices*) были либо фибронектин, либо Corning Matrigel® Matrix, восстановленная базальная мембрана. Приближение условий культивирования *in vitro* к микроокружению *in vivo* способствует увеличению роста и дифференцировки клеток, поддержанию их естественной морфологии [26,27].

В настоящее время развиваются технологии трехмерного культивирования клеток (3D), в которых, в отличие от монослойного (2D) культивирования, клетки растут либо в трехмерном окружении, либо внутри матрикса или каркаса с трехмерной архитектурой [28]. Трехмерные условия культивирования гораздо ближе к нативным условиям, чем выращивание клеток в традиционных фласках или чашках Петри с плоским дном (2D). В живых организмах питание клеток и тканей обеспечивает обширная капиллярная сеть, которая формируется в процессе развития. Перфузионная система также необходима для формирования тканей *in vitro* для создания конструкторов клинически значимых размеров [29]. Основной проблемой 3D культивирования является обеспечение доставки питательных веществ и кислорода к клеткам. Формирование трубчатых сетей осуществляется различными методами. Одним из них является использование коллагеновых гелей животного про-

исхождения (коллагеновое сырье I типа хвостов крыс). Для этого эндотелиоциты диспергируют в трехмерном коллагеновом геле, подвергают воздействию ростовых факторов в присутствии низкого уровня сыворотки. В этих условиях клетки организуются в течение 48 часов в сеть тонкостенных трубок, которые очень похожи на нативные капилляры [30].

Таким образом, при использовании технологии 3D культивирования с правильно подобранным составом, структурой и механическими свойствами клетки могут формировать ткани и органоподобные структуры, повторяющие структуру и функции органа [31,32]. На сегодняшний день широко используется технология 3D культивирования на матрице под названием Матригель (англ. *Matrigel*TM), которая представляет собой внеклеточный матрикс, получаемый как продукт культивирования опухолевых клеток саркомы линии Энгельберта-Хольма-Сворма EHS (англ. *Engelbreth-Holm-Swarm*). Выпускается в двух видах – содержащий факторы роста (англ. *BD Matrigel*TM *Basement Membrane Matrix*) и лишенный факторов роста (англ. *Matrigel*[®] *Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix*). Выбор конкретного вида матригеля зависит от целей проводимого эксперимента. При использовании Матригеля эндотелиоциты начинают образовывать тубулярные структуры с образованием капиллярного просвета и плотных контактов между клетками, что позволяет изучать особенности ангиогенеза в условиях *in vitro* (рис. 2).

Также существует протокол ведения 3D культур, основанный на образовании «сэндвича» из матригеля. Метод заключается в формировании слоистой структуры: сначала формируют нижний слой – заливают дно культуральной посуды матригелем, затем на нижний слой высевают культуру клеток, после добавляют верхний слой – смесь матригеля и среды для роста [33]. Альтернативой использованию Матригеля может выступать матрица Джелтрекс (англ. *Geltrex*TM) – растворимая форма базальной мембраны, выделенная из опухолей линии



Рис. 2. Пример 3D культивирования. Образование капилляроподобных структур (тубулогенез) в культуре эндотелиоцитов HUVEC на матригеле, лишенном факторов роста. Ув. $\times 200$. Лаборатория клеточных технологий ЦНИЛ

ENS. Основные компоненты матрицы Geltrex™ включают в себя ламинин, коллаген IV, энтактин, гепарансульфат и протеогликаны. Она предназначена для роста и поддержания дифференцированных фенотипов в различных клеточных культурах, включая первичные эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, клетки гладких мышц и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки [34].

Несмотря на то, что проверенная временем 2D культура клеток оказалась ценным методом для клеточных исследований, ее ограничения все чаще признаются. 2D клеточная культура не позволяет учитывать естественное трехмерное окружение клеток. В результате данные, которые получаются при изучении 2D-клеточных культур, в ряде случаев могут давать недостоверные результаты по сравнению с условиями 3D и *in vivo*. Системы 3D-культивирования клеток имеют более высокую степень организации, что приближает их к естественным условиям существования эндотелиоцитов [35].

При переходе от 2D к 3D культивированию одним из очевидных изменений является наличие механической среды, которая имеет важное значение для клеточной адгезии, распространения, миграции и дифференцировки клеток. Трехмер-

ные модели позволяют создавать определенные условия миграции и проникновения различных веществ. Клетки в 3D культуре морфологически и физиологически отличаются от клеток в 2D культуре. Именно дополнительная размерность трехмерных культур является критической характеристикой, приводящей к различиям в клеточных реакциях, поскольку она не только влияет на пространственную организацию рецепторов клеточной поверхности, участвующих во взаимодействиях с окружающими клетками, но также вызывает физические ограничения для клеток. Эти пространственные и физические аспекты в трехмерных культурах влияют на передачу сигнала снаружи внутрь клетки и в конечном итоге влияют на экспрессию генов и поведение клеток. Большинство двумерных методов не могут поддерживать форму клетки, которая определяет биофизические сигналы, влияющие на активность клеток *in vivo*. 3D методы обеспечивают равномерный доступ питательных веществ и факторов роста, присутствующих в среде, что приводит к гомогенному росту и пролиферации. Жидкая среда в традиционной 2D-культуре клеток не всегда позволяет поддерживать желаемые концентрации и градиенты факторов роста [36,37].

Переход от рутинного 2D культивирования к 3D моделям является многообещающим, но возможность рутинного применения технологии и более высокая стоимость по-прежнему являются главными ограничениями в реализации этого перехода. Требуется дальнейшая работа для обеспечения оптимальных воспроизводимости, методов считывания и автоматизации данных для создания стандартизированных и проверенных трехмерных моделей клеточных культур.

Эндотелиоциты, полученные из эмбриональных стволовых и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

В последние декады существенные усилия по изучению сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний в лабораторных условиях направлены на изучение стволовых клеток и эндотелиальных клеток-предшественников. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК, англ. *embryonic stem cells, ESC*) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК, англ. *induced pluripotent stem cells, iPSC*) являются привлекательными *in vitro* моделями в изучении эндотелиальной дисфункции, ангиогенеза, а также в сфере тканевой инженерии.

Различные линии клеток ЭСК и ИПСК по-разному реагируют на одни и те же факторы микроокружения. Дифференцировка плюрипотентных ЭСК в эндотелиальные клетки (ЭК) обусловлена преимущественно высокой плотностью посева клеток и передачей сигналов фибронектиновым матриксом, с минимальной зависимостью от воздействия факторов роста, в частности, VEGF [38]. Несмотря на привлекательность ЭСК для исследовательского и возможного клинического использования благодаря плюрипотентности и неограниченной пролиферации, их применение имеет ряд ограничений, связанных как со сложностью переноса экспериментальной ситуации в клинические условия из-за возможного формирования тератом и изменения дифференцировки *in vivo*, так и с этическими проблемами, связанными с работой с человеческими эмбрионами.

Альтернативой могут служить индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, представляющие собой особый тип клеток, которые происходят путем перепрограммирования генома взрослых стволовых клеток, таких как, например, дермальные фибробласты, в плюрипотентное состояние. Эти клетки имеют много общего с эмбриональными стволовыми клетками, и их перепрограммирование требует транскрипционных факторов OCT4, SOX2, KLF4, с-Мус, так называемых факторов, или «коктейля» Яманаки, в честь ученого-первооткрывателя ИПСК [39]. ИПСК характеризуются способностью к восстановлению и дифференцировке в различные типы клеток, такие как гепатоциты, кардиомиоциты, эндотелиоциты, гемопоэтические клетки. Про ИПСК можно сказать, что они «открывают двери» новым методам изучения и лечения многих заболеваний, особенно в области персонализированной регенеративной медицины [40].

ЭК могут быть получены из ЭСК и ИПСК с помощью 3 основных методов:

1) Во-первых, ЭСК и ИПСК можно дифференцировать в условиях, которые способствуют самоорганизации клеток в трехмерные эмбриоидные тела (ЭТ) в суспензионной культуре. Многочисленные линии клеток будут появляться внутри ЭТ, которые спонтанно подвергаются дифференцировке в 3 зародышевых слоя: эктодерму, энтодерму и мезодерму. Именно из подмножества мезодермы появляются как гемопоэтические, так и ЭК. ЭК самоорганизуются в сосудистые структуры внутри ЭТ. Добавление различных, упомянутых в данной статье, факторов роста будет способствовать усилению дифференциации ЕС в рамках ЭТ.

2) Во втором способе дифференцирование ЭСК и ИПСК совместно культивируют с определенным типом стромальных клеток, чтобы способствовать дифференцировке линии ЭК из мезодермы: клетки OP9 широко используются для содействия подобной дифференциации, и облегчают появление сердечной, кровеносной, эндотелиальной и других линий.

3) Некоторые исследователи предпочитают дифференцировать ЭСК и ИПСК на планшетах, покрытых белковыми субстратами (матригель, фибронектин, желатин или другие белки) с использованием специфических культуральных сред с последовательно добавленными рекомбинантными факторами роста [41].

Независимо от того, какой из 3-х методов выбран, из ЭСК и ИПСК происходят многочисленные линии клеток, при этом использование факторов роста и их ингибиторов, малых молекул и нейтрализующих антител используется для содействия образованию искомой клеточной линии. В целом необходимо отметить, что использование моноклональных антител с целью идентификации определенных молекул клеточной поверхности или генетической маркировки ЭСК или ИПСК требуется для каждого из трех методов дифференцировки.

Prasain N., et al. (2014) сообщают о возможности дифференцировать плюрипотентные стволовые клетки человека в эндотелиальные клетки со свойствами эндотелиальных колониобразующих клеток пуповинной крови, что может позволить получить достаточное количество высокопролиферативных клеток для восстановления функции эндотелия у пациентов с сосудистыми заболеваниями: в эксперименте подобные клетки проявляли стабильный эндотелиальный фенотип с высоким клональным пролиферативным потенциалом и способностью формировать человеческие сосуды у мышей с целью восстановления функции ишемизированной сетчатки и конечностей [42]. В работе Lin Y., et al. (2017) опубликованы данные по способам оптимизации дифференциации ЭК из ИПСК [43]. Методика состоит в культивировании монослоя клеток на покрытой матрицей культуральной пластине с обработкой различными молекулами или факторами роста, с целью постепенной дифференциации от ИПСК до мезодермы и, наконец, к линии ЭК. В некоторых протоколах меняются культуральная среда и факторы роста между стадиями мезодермы

и эндотелия, другие подразумевают очищение клеток мезодермы или незрелых ЭК путём обнаружения клеток, экспрессирующих маркеры KDR, CD34, MESP1, или CD3167 между этими двумя фазами.

Манипулирование сигнальными путями, которые определяют дифференциацию мезодермы из ИПСК, является общим для ряда систем разделения монослоев. Часто используются факторы Activin A, BMP4 и bFGF [44,45]. Для дальнейшего повышения эффективности дифференциации ЭК от ИПСК требуется более глубокое понимание развития эндотелиоцитов. Исследователи пытаются обнаружить новые сигнальные пути или разработать новые условия для культивирования для улучшения дифференцировки ЭК [46]. Так, в работе Takeshi I., et al. (2017) сообщается о разработанном ими методе, который впоследствии может стать ценной технологической основой для развития регенеративной медицины и трехмерной тканевой инженерии, представляющем собой дифференцировку ЭК из линий плюрипотентных стволовых клеток человека на основе двумерной монослойной культуры без сыворотки. В представленной методике осуществляется контроль направления дифференцировки от мезодермы к ЭК с использованием ступенчатой специфической стимуляции с помощью VEGF и циклического АМФ [47].

В последнее десятилетие были разработаны многочисленные методы дифференцирования ЭК от ИПСК, рассмотрен потенциал применения ИПСК в регенеративной медицине. Кроме того, создаются индивидуальные линии ИПСК для конкретных пациентов; ЭК, дифференцированные от подобных линий, могут быть использованы для изучения и коррекции различных патологических состояний в рамках персонализированной медицины. Накопление знаний об эндотелиоцитах, полученных из ИПСК, оптимизация методик их получения и применения будут способствовать разработке новых стратегий изучения, диагностики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Заключение

Работа с эндотелиальными клетками *in vitro* позволяет проводить специфичные, доступные и подробные исследования различных заболеваний сердечно-сосудистой системы. Несмотря на все достоинства, данный вид исследований имеет ограничения, главным из которых является сложность сопоставления результатов изучения патологических состояний в рамках лабораторной работы и оценки биологии целого организма в естественных физиологических или патологических условиях. Поэтому чрезвычайно важно продолжить оптимизировать *in vitro* методики работы с

эндотелиальными клетками различного происхождения, в том числе от индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, что позволит разрабатывать и применять последовательные надежные процедуры экстраполяции результатов *in vitro* исследований в условия *in vivo*.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование спонсорской поддержки не имело.

Литература

1. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Пшенников А.С., и др. Возможности фармакотерапии хронической венозной недостаточности препаратами диосмина с позиции функционального состояния эндотелия // *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2015. Т. 21, №3. С. 91-97.
2. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Климентова Э.А., и др. Апоптоз в сосудистой патологии: настоящее и будущее // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2020. Т. 28, №1. С. 79-87. doi:10.23888/PAV-LOVJ202028179-87
3. Alberts B., Johnson A., Lewis J., et al. *Blood Vessels and Endothelial Cells*. In: *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
4. Chi J.T., Chang H.Y., Haraldsen G., et al. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003. Vol. 100, №19. P. 10623-10628. doi:10.1073/pnas.1434429100
5. Uwamori H., Ono Y., Yamashita T., et al. Comparison of organ-specific endothelial cells in terms of microvascular formation and endothelial barrier functions // *Microvascular Research*. 2019. Vol. 122. P. 60-70. doi:10.1016/j.mvr.2018.11.007
6. Magdeldin T., López-Dávila V., Pape J., et al. Engineering a vascularised 3D *in vitro* model of cancer progression // *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7. P. 44045. doi:10.1038/srep44045
7. Wang W.M., Zhao Z.L., Ma S.R., et al. Epidermal growth factor receptor inhibition reduces angiogenesis via hypoxia-inducible factor-1 α and Notch1 in head neck squamous cell carcinoma // *PLoS One*. 2015. Vol. 10, №2. P. e0119723. doi:10.1371/journal.pone.0119723
8. Vu K., Weksler B., Romero I., et al. Immortalized human brain endothelial cell line HCMEC/D3 as a model of the blood-brain barrier facilitates *in vitro* studies of central nervous system infection by *Cryptococcus neoformans* // *Eukaryotic Cell*. 2009. Vol. 8, №11. P. 1803-1807. doi:10.1128/EC.00240-09
9. Itoh M., Nakayama K., Noguchi R., et al. Scaffold-Free Tubular Tissues Created by a Bio-3D Printer Undergo Remodeling and Endothelialization when Implanted in Rat Aortae // *PloS One*. 2015. Vol. 10, №9. P. e0136681. doi:10.1371/journal.pone.0136681
10. Dong L., Li Z., Leffler N.R., et al. Acidosis activation of the proton-sensing GPR4 receptor stimulates vascular endothelial cell inflammatory responses revealed by transcriptome analysis // *PloS One*. 2013. Vol. 8, №4. P. e61991. doi:10.1371/journal.pone.0061991
11. Ruiz M.A., Feng B., Chakrabarti S. Polycomb repressive complex 2 regulates MiR-200b in retinal endothelial cells: potential relevance in diabetic retinopathy // *PloS One*. 2015. Vol. 10, №4. P. e0123987. doi:10.1371/journal.pone.0123987
12. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Короткова Н.В., и др. Изучение молекулярных механизмов эндотелиальной дисфункции *in vitro* // *Гены & Клетки*. 2019. Т. 14, №1. С. 22-32. doi:10.23868/201903003
13. Стрельникова Е.А., Трушкина П.Ю., Суков И.Ю., и др. Эндотелий *in vivo* и *in vitro*. Часть 1: гистогенез, структура, цитофизиология и ключевые маркеры // *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2019. Т. 7, №3. С. 450-465. doi:10.23888/HMJ201973450-465
14. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., и др. Сравнение цитотоксичности синтетических сосудистых протезов *in vitro* // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2020. Т. 28, №2. С. 183-192. doi:10.23888/PAVLOVJ2020282183-192
15. Berg E., Polokoff M., O'Mahony A., et al. Elucidating mechanisms of toxicity using phenotypic

- data from primary human cell systems – a chemical biology approach for thrombosis-related side effects // *International Journal of Molecular Sciences*. 2015. Vol. 16, №1. P. 1008-1029. doi:10.3390/ijms16011008
16. Ades E.W., Candal F.J., Swerlick R.A., et al. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line // *Journal of Investigative Dermatology*. 1992. Vol. 99, №6. P. 683-690. doi:10.1111/1523-1747.ep12613748
17. Wills T.B., Heaney A.M., Wardrop K.J., et al. Immunomagnetic isolation of canine circulating endothelial and endothelial progenitor cells // *Veterinary Clinical Pathology*. 2009. Vol. 38, №4. P. 437-442. doi:10.1111/j.1939-165X.2009.00152.x
18. Iba T., Hamakubo T., Nagaoka I., et al. Physiological levels of pentraxin 3 and albumin attenuate vascular endothelial cell damage induced by histone H3 in vitro // *Microcirculation*. 2016. Vol. 23, №3. P. 240-247. doi:10.1111/micc.12269
19. Otto S., Deussen A., Zatschler B., et al. A novel role of endothelium in activation of latent pro-membrane type 1 MMP and pro-MMP-2 in rat aorta // *Cardiovascular Research*. 2016. Vol. 109, №3. P. 409-418. doi:10.1093/cvr/cvv256
20. Mathew J.G. The growth factor effect on endothelial cell dysfunction in the presence of glycated collagen and A β peptide: implications for decreased angiogenesis in diabetes and Alzheimer's disease [dissertation]. Drexel University; 2014. Available at: <https://idea.library.drexel.edu/islandora/object/idea:4555/datastream/OBJ/view>. Accessed: 2020 March 01.
21. Xiong Y., Chan W.Y., Chua A.W., et al. Decellularized porcine saphenous artery for small-diameter tissue-engineered conduit graft // *Artificial Organs*. 2013. Vol. 37, №6. P. E74-E87. doi:10.1111/aor.12014
22. Siow R.C. Culture of human endothelial cells from umbilical veins // *Methods in Molecular Biology*. 2012. Vol. 806. P. 265-274. doi:10.1007/978-1-61779-367-7_18
23. Leopold B., Strutz J., Weiss E., et al. Outgrowth, proliferation, viability, angiogenesis and phenotype of primary human endothelial cells in different purchasable endothelial culture media: feed wisely // *Histochemistry and Cell Biology*. 2019. Vol. 152, №5. P. 377-390. doi:10.1007/s00418-019-01815-2
24. Minehata K.-I., Mukouyama Y.-S., Sekiguchi T., et al. Macrophage colony stimulating factor modulates the development of hematopoiesis by stimulating the differentiation of endothelial cells in the AGM region // *Blood*. 2002. Vol. 99, №7. P. 2360-2368. doi:10.1182/blood.v99.7.2360
25. Семина Е.В., Рубина К.А., Сысоева В.Ю., и др. Трехмерная модель биоматрикса как способ изучения роста кровеносных сосудов и нервов в тканеинженерных конструкциях // *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*. 2016. Т. 57, №3. С. 160-166.
26. Technical Bulletin# 417. Optimization of Cell Culture Systems that Support Growth or Differentiation of Endothelial Cells. Available at: https://www.corning.com/catalog/cls/documents/application-notes/an_DL_050_Optimization_CC_Systems_that_Support_Growth_Differentiation_Endothelial_Cells.pdf. Accessed: 2020 March 01.
27. Лыков А.П., Бондаренко Н.А., Ким И.И., и др. Эффект фибронектина на миграционный потенциал клеток эндотелиальной линии EA.Hy926 // *Бюллетень сибирского отделения российской академии медицинских наук*. 2014. Т. 34, №4. С. 5-10.
28. Engler A., Bacakova L., Newman C., et al. Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses // *Biophysical Journal*. 2004. Vol. 86, №1, Part 1. P. 617-628. doi:10.1016/S0006-3495(04)74140-5
29. Andrée B., Ichanti H., Kalies S., et al. Formation of three-dimensional tubular endothelial cell networks under defined serum-free cell culture conditions in human collagen hydrogels // *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, №1. P. 5437. doi:10.1038/s41598-019-41985-6
30. Obika M., Vernon R.B., Gooden M.D., et al. ADAMTS-4 and biglycan are expressed at high levels and co-localize to podosomes during endothelial cell tubulogenesis *in vitro* // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2014. Vol. 62, №1. P. 34-49. doi:10.1369/0022155413507727
31. Padron J.M., van der Wilt C.L., Smid K., et al. The multilayered postconfluent cell culture as a model for drug screening // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2000. Vol. 36, №2-3. P. 141-157. doi:10.1016/s1040-8428(00)00083-4
32. Lawley T.J., Kubota Y. Induction of morphologic differentiation of endothelial cells in culture // *The Journal of Investigative Dermatology*. 1989. Vol. 93, №2S. P. S59-S61. doi:10.1111/1523-1747.ep12581070
33. Wan X., Bovornchutichai P., Cui Z., et al. Morphological analysis of human umbilical vein endothelial cells co-cultured with ovarian cancer cells in 3D: An oncogenic angiogenesis assay // *PloS One*. 2017. Vol. 12, №7. P. e0180296. doi:10.1371/journal.pone.0180296
34. Lovecchio J., Pannella M., Giardino L., et al. A dynamic culture platform enhances the efficiency of the 3D HUVEC-based tube formation assay // *Biotechnology and Bioengineering*. 2020. Vol. 117, №3. P. 789-797. doi:10.1002/bit.27227
35. Duval K., Grover H., Han L.H., et al. Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture // *Physiology*. 2017. Vol. 32, №4. P. 266-277. doi:10.1152/physiol.00036.2016
36. Edmondson R., Broglie J.J., Adcock A.F., et al. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based bio-

sensors // Assay and drug Development Technologies. 2014. Vol. 12, №4. P. 207-218. doi:10.1089/adt.2014.573

37. Baker B.M., Chen C.S. Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues // *Journal of Cell Science*. 2012. Vol. 125, Part 13. P. 3015-3024. doi:10.1242/jcs.079509
38. Glaser D.E., Turner W.S., Madfis N., et al. Multifactorial Optimizations for Directing Endothelial Fate from Stem Cells // *PLoS One*. 2016. Vol. 11, №12. P. e0166663. doi:10.1371/journal.pone.0166663
39. Liu X., Huang J., Chen T., et al. Yamanaka factors critically regulate the developmental signaling network in mouse embryonic stem cells // *Cell Research*. 2008. Vol. 18, №12. P. 1177-1189. doi:10.1038/cr.2008.309
40. Tucak A., Vrabac Dz., Smajic A., et al. Future trends and possibilities of using induced pluripotent stem cells (iPSC) in regenerative medicine // *CMBEBIH*. 2017. Vol. 3. P. 459-464. doi:10.1007/978-981-10-4166-2_711
41. Yoder M.C. Differentiation of pluripotent stem cells into endothelial cells // *Current Opinion in Hematology*. 2015. Vol. 22, №3. P. 252-257. doi:10.1097/MOH.0000000000000140
42. Prasain N., Lee M.R., Vemula S., et al. Differentiation of human pluripotent stem cells to cells similar to cord-blood endothelial colony-forming cells // *Nature Biotechnology*. 2014. Vol. 32, №11. P. 1151-1157. doi:10.1038/nbt.30483
43. Lin Y., Gil C.H., Yoder M.C. Differentiation, Evaluation, and Application of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Endothelial Cells // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2017. Vol. 37, №11. P. 2014-2025. doi:10.1161/ATVBAHA.117.309962
44. Patsch C., Challet-Meylan L., Thoma E.C., et al. Generation of vascular endothelial and smooth muscle cells from human pluripotent stem cells // *Nature Cell Biology*. 2015. Vol. 17, №8. P. 994-1003. doi:10.1038/ncb3205
45. Palpant N.J., Pabon L., Friedman C.E., et al. Generating high-purity cardiac and endothelial derivatives from patterned mesoderm using human pluripotent stem cells // *Nature Protocols*. 2017. Vol. 12. P. 15-31. doi:10.1038/nprot.2016.153
46. Lian X., Bao X., Al-Ahmad A., et al. Efficient differentiation of human pluripotent stem cells to endothelial progenitors via small-molecule activation of WNT signaling // *Stem Cell Reports*. 2014. Vol. 3, №5. P. 804-816. doi:10.1016/j.stemcr.2014.09.005
47. Ikuno T., Masumoto H., Yamamizu K., et al. Efficient and robust differentiation of endothelial cells from human induced pluripotent stem cells via lineage control with VEGF and cyclic AMP // *PLOS One*. 2017. Vol. 12, №4. P. e0176238. doi:10.1371/journal.pone.0176238

References

1. Kalinin RE, Suchkov IA, Pshennikov AS, et al. Possibilities of Pharmacotherapy for Chronic Venous Insufficiency With Diosmin Preparations From the Position of the Endothelial Functional State. *Angiology and Vascular Surgery*. 2015; 21(3):91-7. (In Russ).
2. Kalinin RE, Suchkov IA, Klimentova EA, et al. Apoptosis in vascular pathology: present and future. *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2020;28(1):79-87. (In Russ). doi:10.23888/PAVLOVJ202028179-87
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Blood Vessels and Endothelial Cells. Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
4. Chi JT, Chang HY, Haraldsen G, et al. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(19):10623-8. doi:10.1073/pnas.1434429100
5. Uwamori H, Ono Y, Yamashita T, et al. Comparison of organ-specific endothelial cells in terms of microvascular formation and endothelial barrier functions. *Microvascular Research*. 2019;122:60-70. doi:10.1016/j.mvr.2018.11.007
6. Magdeldin T, López-Dávila V, Pape J, et al. Engineering a vascularised 3D in vitro model of cancer progression. *Scientific Reports*. 2017;7:44045. doi:10.1038/srep44045
7. Wang WM, Zhao ZL, Ma SR, et al. Epidermal growth factor receptor inhibition reduces angiogenesis via hypoxia-inducible factor-1 α and Notch1 in head neck squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2015;10(2):e0119723. doi:10.1371/journal.pone.0119723
8. Vu K, Weksler B, Romero I, et al. Immortalized human brain endothelial cell line HCMEC/D3 as a model of the blood-brain barrier facilitates in vitro studies of central nervous system infection by *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. 2009; 8(11):1803-7. doi:10.1128/EC.00240-09
9. Itoh M, Nakayama K, Noguchi R, et al. Scaffold-Free Tubular Tissues Created by a Bio-3D Printer Undergo Remodeling and Endothelialization when Implanted in Rat Aortae. *PLoS One*. 2015;10(9): e0136681. doi:10.1371/journal.pone.0136681
10. Dong L, Li Z, Leffler NR, et al. Acidosis activation of the proton-sensing GPR4 receptor stimulates vascular endothelial cell inflammatory responses revealed by transcriptome analysis. *PLoS One*. 2013; 8(4):e61991. doi:10.1371/journal.pone.0061991
11. Ruiz MA, Feng B, Chakrabarti S. Polycomb repressive complex 2 regulates MiR-200b in retinal endothelial cells: potential relevance in diabetic retinopathy. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123987. doi:10.1371/journal.pone.0123987
12. Kalinin RE, Suchkov IA, Korotkova NV, et al. The research of the molecular mechanisms of endothelial dysfunction *in vitro*. *Genes & Cells*. 2019;

- 14(1):22-32. (In Russ). doi:10.23868/201903003
13. Strelnikova EA, Trushkina PYu, Surov IYu, et al. Endothelium *in vivo* and *in vitro*. Part 1: histogenesis, structure, cytophysiology and key markers. *Nauka Molodykh (Eruditio Juvenium)*. 2019;7(3):450-65. (In Russ). doi:10.23888/HMJ201973450-465
14. Kalinin RE, Suchkov IA, Mzhavanadze ND, et al. Comparison of cytotoxicity of vascular prostheses *in vitro*. *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2020;28(2):183-92. (In Russ). doi:10.23888/PAVLOVJ2020282183-192
15. Berg EL, Polokoff MA, O'Mahony A, et al. Elucidating mechanisms of toxicity using phenotypic data from primary human cell systems – a chemical biology approach for thrombosis-related side effects. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(1):1008-29. doi:10.3390/ijms16011008
16. Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, et al. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *Journal of Investigative Dermatology*. 1992;99(6):683-90. doi:10.1111/1523-1747.ep12613748
17. Wills TB, Heaney AM, Wardrop KJ, et al. Immunomagnetic isolation of canine circulating endothelial and endothelial progenitor cells. *Veterinary Clinical Pathology*. 2009;38(4):437-42. doi:10.1111/j.1939-165X.2009.00152.x
18. Iba T, Hamakubo T, Nagaoka I, et al. Physiological levels of pentraxin 3 and albumin attenuate vascular endothelial cell damage induced by histone h3 *in vitro*. *Microcirculation*. 2016;23(3):240-7. doi:10.1111/micc.12269
19. Otto S, Deussen A, Zatschler B, et al. A novel role of endothelium in activation of latent pro-membrane type 1 MMP and pro-MMP-2 in rat aorta. *Cardiovascular Research*. 2016;109(3):409-18. doi:10.1093/cvr/cvv256
20. Mathew JG. *The growth factor effect on endothelial cell dysfunction in the presence of glycated collagen and Aβ peptide: implications for decreased angiogenesis in diabetes and Alzheimer's disease* [dissertation]. Drexel University; 2014. Available at: <https://idea.library.drexel.edu/islan-dora/object/idea:4555/datastream/OBJ/view>. Accessed: 2020 March 01.
21. Xiong Y, Chan WY, Chua AW, et al. Decellularized porcine saphenous artery for small-diameter tissue-engineered conduit graft. *Artificial Organs*. 2013;37(6):E74-E87. doi:10.1111/aor.12014
22. Siow RC. Culture of human endothelial cells from umbilical veins. *Methods in Molecular Biology*. 2012;806:265-74. doi:10.1007/978-1-61779-367-7_18
23. Leopold B, Strutz J, Weiß E, et al. Outgrowth, proliferation, viability, angiogenesis and phenotype of primary human endothelial cells in different purchasable endothelial culture media: feed wisely. *Histochemistry and Cell Biology*. 2019;152(5):377-90. doi:10.1007/s00418-019-01815-2
24. Minehata K-I, Mukouyama Y-S, Sekiguchi T, et al. Macrophage colony stimulating factor modulates the development of hematopoiesis by stimulating the differentiation of endothelial cells in the AGM region. *Blood*. 2002;99(7):2360-8. doi:10.1182/blood.v99.7.2360
25. Semina EV, Rubina KA, Sysoeva VYu, et al. 3D-model of biomatrix as a method of studying blood vessels and nerves growth in tissue engineering structures. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seriya 2. Khimiya*. 2016;57(3):160-6. (In Russ).
26. Technical Bulletin# 417. Optimization of Cell Culture Systems that Support Growth or Differentiation of Endothelial Cells. Available at: https://www.corning.com/catalog/cls/documents/application-notes/an_DL_050_Optimization_CC_Systems_that_Support_Growth_Differentiation_Endothelial_Cells.pdf. Accessed: 2020 March 01.
27. Lykov AP, Bondarenko NA, Kim II, et al. The effects of fibronectin on the migration activity of endothelial cell line EA.HY926. *The Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*. 2014;34(4):5-10. (In Russ).
28. Engler A, Bacakova L, Newman C, et al. Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophysical Journal*. 2004;86(1, Pt 1):617-28. doi:10.1016/S0006-3495(04)74140-5
29. Andree B, Ichanti H, Kalies S, et al. Formation of three-dimensional tubular endothelial cell networks under defined serum-free cell culture conditions in human collagen hydrogels. *Scientific Reports*. 2019;9(1):5437. doi:10.1038/s41598-019-41985-6
30. Obika M, Vernon RB, Gooden MD, et al. ADAMTS-4 and biglycan are expressed at high levels and co-localize to podosomes during endothelial cell tubulogenesis *in vitro*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2014;62(1):34-49. doi:10.1369/0022155413507727
31. Padron JM, van der Wilt CL, Smid K, et al. The multilayered postconfluent cell culture as a model for drug screening. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2000;36(2-3):141-57. doi:10.1016/s1040-8428(00)00083-4
32. Lawley TJ, Kubota Y. Induction of morphologic differentiation of endothelial cells in culture. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1989;93(2 Suppl):59S-61S. doi:10.1111/1523-1747.ep12581070
33. Wan X, Bovornchutichai P, Cui Z, et al. Morphological analysis of human umbilical vein endothelial cells co-cultured with ovarian cancer cells in 3D: An oncogenic angiogenesis assay. *PLoS One*. 2017;12(7):e0180296. doi:10.1371/journal.pone.0180296
34. Lovecchio J, Pannella M, Giardino L, et al. A dynamic culture platform enhances the efficiency of the 3D HUVEC-based tube formation assay. *Bio-technology and Bioengineering*. 2020;117(3):789-97. doi:10.1002/bit.27227
35. Duval K, Grover H, Han LH, et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology*. 2017;32(4):266-77. doi:10.1152/physiol.00036.2016

36. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, et al. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug Development Technologies*. 2014;12(4):207-18. doi:10.1089/adt.2014.573
37. Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of Cell Science*. 2012; 125(Pt 13):3015-24. doi:10.1242/jcs.079509
38. Glaser DE, Turner WS, Madfis N, et al. Multifactorial Optimizations for Directing Endothelial Fate from Stem Cells. *PLoS One*. 2016;11(12):e0166663. doi:10.1371/journal.pone.0166663
39. Liu X, Huang J, Chen T, et al. Yamanaka factors critically regulate the developmental signaling network in mouse embryonic stem cells. *Cell Research*. 2008;18(12):1177-89. doi:10.1038/cr.2008.309
40. Tucak A, Vrabac Dz, Smajic A, et al. Future trends and possibilities of using induced pluripotent stem cells (iPSC) in regenerative medicine. *СМБЕВИН*. 2017;3:459-64. doi:10.1007/978-981-10-4166-2_711
41. Yoder MC. Differentiation of pluripotent stem cells into endothelial cells. *Current Opinion in Hematology*. 2015;22(3):252-7. doi:10.1097/МОН.0000000000000140
42. Prasain N, Lee MR, Vemula S, et al. Differentiation of human pluripotent stem cells to cells similar to cord-blood endothelial colony-forming cells. *Nature Biotechnology*. 2014;32(11):1151-7. doi:10.1038/nbt.30483
43. Lin Y, Gil CH, Yoder MC. Differentiation, Evaluation, and Application of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Endothelial Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2017;37(11):2014-25. doi:10.1161/ATVBAHA.117.309962
44. Patsch C, Challet-Meylan L, Thoma EC, et al. Generation of vascular endothelial and smooth muscle cells from human pluripotent stem cells. *Nature Cell Biology*. 2015;17(8):994-1003. doi:10.1038/ncb3205
45. Palpant NJ, Pabon L, Friedman CE, et al. Generating high-purity cardiac and endothelial derivatives from patterned mesoderm using human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*. 2017;12:15-31. doi:10.1038/nprot.2016.153
46. Lian X, Bao X, Al-Ahmad A, et al. Efficient differentiation of human pluripotent stem cells to endothelial progenitors via small-molecule activation of WNT signaling. *Stem Cell Reports*. 2014; 3(5):804-16. doi:10.1016/j.stemcr.2014.09.005
47. Ikuno T, Masumoto H, Yamamizu K, et al. Efficient and robust differentiation of endothelial cells from human induced pluripotent stem cells via lineage control with VEGF and cyclic AMP. *PLoS One*. 2017;12(4):e0176238. doi:10.1371/journal.pone.0176238

Информация об авторах [Authors Info]

Мзхаванадзе Нина Джансуговна – к.м.н., доцент кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной, оперативной хирургии и топографической анатомии, с.н.с. ЦНИЛ, Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Рязань, Российская Федерация. E-mail: nina_mzhavanadze@mail.ru

SPIN: 7757-8854, ORCID ID: 0000-0001-5437-1112, Researcher ID: M-1732-2016.

Nina D. Mzhavanadze – MD, PhD, Associate Professor of the Department of Cardiovascular, X-Ray Endovascular, Operative Surgery and Topographic Anatomy, Senior Researcher at the Central Research Laboratory, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation. E-mail: nina_mzhavanadze@mail.ru

SPIN: 7757-8854, ORCID ID: 0000-0001-5437-1112, Researcher ID: M-1732-2016.

Короткова Наталья Васильевна – к.м.н., доцент кафедры биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО, с.н.с. ЦНИЛ, Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Рязань, Российская Федерация.

SPIN: 3651-3813, ORCID ID: 0000-0001-7974-2450, Researcher ID: I-8028-2018.

Natalya V. Korotkova – MD, PhD, Associate Professor of the Department of Biological Chemistry with Course of Clinical Laboratory Diagnostics of the Faculty of Additional Professional Education, Senior Researcher at the Central Research Laboratory, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation.

SPIN: 3651-3813, ORCID ID: 0000-0001-7974-2450, Researcher ID: I-8028-2018.

Стрельникова Екатерина Андреевна – студент 6 курса медико-профилактического факультета, Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Рязань, Российская Федерация.

ORCID ID: 0000-0002-3370-1095.

Ekaterina A. Strelnikova – 6th-year Student of the Faculty of Medicine and Prevention, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation.

ORCID ID: 0000-0002-3370-1095.

Суров Иван Юрьевич – студент 6 курса лечебного факультета, Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Рязань, Российская Федерация.

SPIN: 1489-7481, ORCID ID: 0000-0002-0794-4544.

Ivan Yu. Surov – 6th-year Student of the Faculty of Medicine, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation.

SPIN: 1489-7481, ORCID ID: 0000-0002-0794-4544.

Иванова Полина Юрьевна – студент 6 курса лечебного факультета, Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Рязань, Российская Федерация.

ORCID ID: 0000-0001-6943-0277.

Polina Yu. Ivanova – 6th-year Student of the Faculty of Medicine, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation.

ORCID ID: 0000-0001-6943-0277.

Боженова Анастасия Дмитриевна – студент 4 курса лечебного факультета, Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Рязань, Российская Федерация.

ORCID ID: 0000-0002-2790-0303.

Anastasia D. Bozhnova – 4th year Student of the Faculty of Medicine, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation.

ORCID ID: 0000-0002-2790-0303.

Цитировать: Мжаванадзе Н.Д., Короткова Н.В., Стрельникова Е.А., Суров И.Ю., Иванова П.Ю., Боженова А.Д. Эндотелий *in vivo* и *in vitro*. Часть 2: особенности и перспективы лабораторной работы с эндотелиоцитами // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2020. Т. 8, №3. С. 407-421. doi:10.23888/HMJ202083407-421

To cite this article: Mzhavanadze ND, Korotkova NV, Strelnikova EA, Surov IYu, Ivanova PYu, Bozhnova AD. Endothelium *in vivo* and *in vitro*. Part 2: features and perspectives of laboratory work with endothelial cells. *Science of the young (Eruditio Juvenium)*. 2020;8(3):407-21. doi:10.23888/HMJ202083407-421

Поступила / Received: 01.03.2020
Принята в печать / Accepted: 02.09.2020