

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Стрельникова Екатерина Андреевна

**Изучение влияния индуктора нитрозативного стресса пероксинитрита
на эндотелиально-мезенхимальный переход
в первичной культуре эндотелиоцитов *in vitro***

1.5.4. Биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Мжаванадзе Нина Джансуговна

Рязань – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1. EndMT: определение, механизм и физиологическая роль	15
1.2. Маркеры EndMT.....	19
1.3. Индукторы EndMT	24
1.4. Сигнальные пути EndMT	25
1.5. Ингибиторы EndMT	31
1.6. Моделирование эндотелиально-мезенхимального перехода в экспериментальных условиях	33
1.7. Нитрозативный стресс	36
1.8. Синтез оксида азота (II).....	38
1.9. Сигнальный путь оксида азота	40
1.10. Эффекты оксида азота (II) и пероксинитрита в норме и патологии.....	41
1.11. Моделирование нитрозативного стресса в экспериментальных условиях.	43
1.12. Клеточная культура HUVEC: источник, использование в медико- биологических исследованиях.....	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	48
2.1. Дизайн исследования.....	48
2.2. Объект экспериментальных исследований	49
2.3. Получение первичных культур клеток	50
2.4. Подтверждение принадлежности первичных культур клеток к HUVEC и визуализация маркеров EndMT методом иммуноцитохимии	52
2.5. МТТ-тест	53
2.6. Моделирование нитрозативного стресса в первичной культуре эндотелиоцитов HUVEC	55

2.7. Определение показателей нитрозативного стресса.....	56
2.8. Определение уровня оксида азота при помощи флуоресцентных зондов DAF-FM.....	56
2.9. Определение битирозина методом спектрофлуориметрии	58
2.10. Определение относительного количества 3-нитротирозина методом вестерн-блот.....	58
2.11. Моделирование EndMT в культурах первичных эндотелиоцитов HUVEC	61
2.12. Определение эндотелиальных и мезенхимальных маркеров EndMT методом вестерн-блот	61
2.13. Статистическая обработка данных.....	62
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ	63
3.1. Подтверждение принадлежности первичных культур клеток к HUVEC	63
3.2. МТТ-тест.....	66
3.3. Влияние пероксинитрита на изменение показателей нитрозативного стресса (подтверждение эффективности моделирования НС).....	68
3.3.1. Определение уровня NO	68
3.3.2. Определение 3-нитротирозина	71
3.3.3. Определение битирозина	73
3.4. Оценка эффективности моделирования TGF- β 1-индуцированного EndMT <i>in vitro</i> в первичных культурах HUVEC	74
3.4.1. Определение маркеров эндотелиального профиля (CD31 и vWF).....	74
3.4.2. Определение маркеров мезенхимального профиля (FN и VIM).....	76
3.4.3. Изменение морфологии первичных культур HUVEC при воздействии TGF- β 1	77
3.4.5. Определение маркеров мезенхимального профиля (FN и VIM).....	79
3.5. Влияние пероксинитрита на показатели маркеров EndMT	82

3.5.1. Изменения эндотелиальных маркеров (CD31 и vWF) под действием пероксинитрита	82
3.5.2. Изменения мезенхимальных маркеров (FN и VIM) под действием пероксинитрита	84
3.6. Влияние пероксинитрита на TGF- β 1-индуцированный EndMT	88
3.6.1. Изменения эндотелиальных маркеров (CD31 и vWF) под воздействием пероксинитрита на EndMT.....	88
3.6.2. Изменения мезенхимальных маркеров (FN и VIM) при воздействии пероксинитрита на EndMT.....	91
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	95
ВЫВОДЫ	99
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	100
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	101
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	105

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Эндотелиально-мезенхимальный переход (endothelial-mesenchymal transition, EndMT) – это динамический процесс сложной молекулярной и клеточной перестройки эндотелиальных клеток, при котором происходит полная или частичная потеря их эндотелиальной идентичности и приобретение мезенхимальных характеристик. EndMT был впервые описан в эмбриональном развитии сердца, однако данный процесс может стать звеном патогенеза множества заболеваний и способствовать фиброзу тканей и метастазированию опухолей [1–4].

Важным свойством EndMT является способность к самоподдержанию. Даже при устранении первоначального импульса процесс все равно будет продолжаться по петле положительной обратной связи, что делает его основной причиной неотвратимого прогрессирования заболеваний [5]. Подтверждение EndMT проводится определением показателей, которые соответствуют обязательными характеристикам: 1) сниженная экспрессия эндотелиальных генов; 2) повышенная экспрессия мезенхимальных генов. Наиболее часто используют такие эндотелиальные маркеры как: CD31, фактор фон Виллебранда, VE-кадгерин и мезенхимальные маркеры: α -гладкомышечный актин (α -SMA), фибронектин, виментин, кальпонин. Однако нет единого мнения о том, какие гены/белки следует изучать, в каком количестве и какой уровень изменений является допустимым. Дополнительно изучают повышенную экспрессию транскрипционных факторов, ассоциированных с эндотелием сосудов: TWIST, SMAD3, ZEB2, SNAI1 и SNAI2 [6–11].

Оксид азота (II, NO) признан газообразным химическим медиатором, участвующим в регуляции многочисленных биохимических и физиологических процессов человеческого организма, проявляя как антиоксидантные, так и прооксидантные свойства [12–17]. Низкие концентрации, как правило, оказывают

защитное действие, тогда как более высокие концентрации или его взаимодействие с другими реактивными формами приводят к значительному прооксидантному эффекту. Воздействие NO как газотрансмиттера или цитотоксического агента зависит от окислительно-восстановительной среды и его концентрации. Высокие концентрации NO приводят к дисбалансу антиоксидантных систем, образованию активных форм азота (АФА) и возникновению нитрозативного стресса (НС) [18–20]. НС влияет на развитие заболеваний посредством нарушения процессов передачи сигналов в клетках, энергетического обмена, транскрипции мРНК, посттрансляционной модификации белков и функционирования ионных каналов. Токсичность NO в условиях НС заключается в образовании более реакционноспособных NO-производных окислителей.

Основным участником НС признан анион пероксинитрита (ONOO^-), который образуется в реакции NO с супероксидом (O_2^-). Пероксинитрит вступает в реакции нитрозилирования молекул белков и липидов, что приводит к нарушению их функции или гибели клеток [21–24]. Все больше экспериментальных данных, полученных на клеточных моделях, подтверждают наличие у пероксинитрита новых функций и меняют представление о его патофизиологических ролях [24–26].

В настоящее время НС играет важную роль в развитии ряда патологических процессов, однако остается не до конца изученным его влияние на EndMT. В этой области существует ряд проблем, например, отсутствие четкого функционального и молекулярного определения EndMT, отсутствие единых стандартов определяемых маркеров, а также локализации их определения и установленных количественных и качественных изменений, уровни которых являются адекватно отражающими изменения, а также недостаточная изученность его роли в патогенезе заболеваний. Трудностью для изучения является отсутствие стандартизованных общепринятых протоколов моделирования НС и EndMT и результаты настоящего исследования показывают новые эффективные решения существующих проблем.

Степень разработанности проблемы

В процессе эмбриогенеза и прогрессирования заболеваний эндотелиоциты демонстрируют значительную пластичность, которая заключается в способности к переходу из одного клеточного типа в другой. Такая фенотипическая изменчивость эндотелиоцитов была признана новым типом трансдифференцировки клеток [27–29]. Считалось, что EndMT активен только во время эмбрионального развития сердца и других органов, однако было установлено, что во взрослом организме EndMT также возможен и играет значительную роль в развитии и прогрессировании множества заболеваний. Молекулярные механизмы регуляции EndMT, как патогенетического звена заболеваний изучены недостаточно.

Нитрозативный стресс, как важное нарушение метаболизма азота, тесно связан с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Учитывая тот факт, что действие оксида азота может быть как цитопротекторным, так и цитотоксическим, и то, что он синтезируется эндотелием как в норме, так и при патологии, представляется весьма интересным изучение взаимодействия эндотелиальной пластичности и нитрозативного стресса. В современной научной литературе недостаточно данных, описывающих воздействие НС на EndMT.

На кафедре биологической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России длительно изучается влияние окислительного и нитрозативного стресса на фундаментальные процессы протекающие в клетке [30]. На кафедре сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики проводятся исследования различных аспектов функционирования эндотелия и эндотелиальной дисфункции [31]. Немногочисленные научные данные о влиянии нитрозативного стресса на эндотелиальную трансдифференцировку стали определяющей причиной выбора направления исследования – влияния пероксинитрита на показатели эндотелиально-мезенхимального перехода в первичной культуре эндотелиальных клеток.

Цель исследования

Изучить влияние индуктора нитрозативного стресса пероксинитрита на эндотелиально-мезенхимальный переход в первичной культуре эндотелиоцитов HUVEC *in vitro*.

Задачи исследования

1. Изучить метаболическую активность первичных культур HUVEC при моделировании нитрозативного стресса путем воздействия различных концентраций и времени экспозиции пероксинитрита.

2. Оценить эффективность моделирования нитрозативного стресса *in vitro* в первичных культурах HUVEC с использованием пероксинитрита путем определения в лизатах клеток уровня оксида азота (II) (флуоресцентные зонды) и относительного количества 3-нитротирозина.

3. Оценить эффективность моделирования EndMT *in vitro* при воздействии рекомбинантного человеческого TGF- β 1 на первичные культуры HUVEC путем определения в клеточных лизатах относительного количества эндотелиальных маркеров EndMT - молекулы клеточной адгезии-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1 или CD 31), фактора фон Виллебранда (von Willebrand factor, vWF); мезенхимальных маркеров – фибронектин (Fibronectin, FN) и виментин (Vimentin, VIM).

4. Определить влияние пероксинитрита на изменение относительного количества эндотелиальных и мезенхимальных маркеров EndMT в лизатах интактных первичных культур HUVEC.

5. Изучить влияние пероксинитрита на первичные культуры HUVEC, находящиеся в состоянии TGF- β 1-индуцированного EndMT путем определения в клеточных лизатах относительного количества эндотелиальных (CD31, vWF) и мезенхимальных (FN, vimentin) маркеров EndMT.

Научная новизна

Разработана модель индукции EndMT *in vitro*. Суть модели заключается в подборе определенных параметров концентрации и времени, а именно: инкубация первичных культур HUVEC с рекомбинантным человеческим TGF- β 1 в концентрации 10 нг/мл в течение 72 часов, что позволяет достоверно моделировать EndMT *in vitro*. По результатам исследования был получен патент «Способ моделирования эндотелиально-мезенхимального перехода в первичной культуре эндотелиоцитов HUVEC», дата регистрации 21.10.2025, №2848736.

Разработана модель индукции НС *in vitro*. Суть модели заключается в определении концентраций индуктора НС и времени экспозиции. Инкубация первичных культур HUVEC с пероксинитритом в конечных концентрациях 10 – 500 мкМ в течение 2 часов является эффективным способом моделирования нитрозативного стресса *in vitro*, о чем свидетельствует повышение маркеров НС. По результатам исследования получен патент «Способ моделирования нитрозативного стресса в первичной культуре эндотелиоцитов HUVEC», дата регистрации 02.02.2026, № 2855781.

Впервые установлено, что пероксинитрит в конечных концентрациях 10, 50, 100, 250 и 500 мкМ в течение 2 часов оказывает ингибирующее воздействие на TGF- β 1-индуцированный EndMT в первичных культурах HUVEC *in vitro*, о чем свидетельствует повышение относительного количества эндотелиальных маркеров и снижение мезенхимальных маркеров в клеточных лизатах первичных культур HUVEC.

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе исследования были получены фундаментальные знания о том, что пероксинитрит является ингибитором TGF- β 1-индуцированного EndMT *in vitro*. Высокие концентрации пероксинитрита вызывают развитие выраженного

нитрозативного стресса, что нивелирует индуцирующее действие человеческого рекомбинантного TGF- β 1 на EndMT в первичных культурах HUVEC.

По результатам экспериментальных данных установлено, что воздействие пероксинитрита приводит к повышению уровня эндотелиальных (CD31, vWF) и снижению уровня мезенхимальных (FN, vimentin) маркеров EndMT.

Полученные результаты имеют важное практическое значение и дают обоснование для широкого использования в лабораторной практике моделей TGF- β 1-индуцированного эндотелиально-мезенхимального перехода и нитрозативного стресса путем воздействия пероксинитрита.

Результаты исследования внедрены в учебно-образовательный процесс на кафедре биологической химии и научно-практическую деятельность междисциплинарного научно-образовательного лабораторного центра МНОЛЦ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Методология и методы исследования

Работа выполнена *in vitro* с использованием первичных культур эндотелиальных клеток вены пуповины человека HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells). Пероксинитрит использовали в качестве индуктора нитрозативного стресса. Эндотелиально-мезенхимальный переход моделировали путем инкубации первичных культур HUVEC с человеческим рекомбинантным TGF β -1. Изменение метаболической активности первичных культур клеток при воздействии индуктора нитрозативного стресса пероксинитрита анализировали по результатам МТТ-теста. Выраженность НС выявляли по изменению относительного количества 3-нитротирозина в клеточных лизатах (вестерн-блот), внутриклеточный уровень оксида азота (NO) определяли при помощи флуоресцентных зондов (DAF-FM) и содержания битирозина (спектрофлуориметрия). Относительное количество эндотелиальных и мезенхимальных маркеров EndMT анализировали методом вестерн-блота,

визуальную локализацию исследуемых маркеров – с помощью иммуноцитохимического исследования. Полученные результаты хранились и анализировались с помощью программ Microsoft Excel, «Statsoft Statistica 13.0» и GraphPad Prism 8.

Личный вклад

Автор самостоятельно проанализировал достаточный объем научной информации, собрал и подготовил обзор литературы, провел большую часть экспериментальных исследований *in vitro* на базе междисциплинарного научно-образовательного лабораторного центра РязГМУ, выполнил сбор, обработку и интерпретацию результатов, подготовил научные публикации по диссертационной работе. Личный вклад автора в выполнение диссертационной работы составляет более 90%.

Положения, выносимые на защиту

1. Использование пероксинитрита при моделировании нитрозативного стресса *in vitro* оказывает влияние на метаболическую активность в первичных культурах HUVEC со статистически значимыми различиями при использовании концентрации 250 мкМ при времени экспозиции 30 и 60 минут ($p=0,014$), 30 и 120 минут ($p=0,001$).

2. Использование пероксинитрита в концентрациях 10, 50, 100, 250 и 500 мкМ и времени экспозиции 2 часа позволяет достоверно моделировать нитрозативный стресс *in vitro*, что отражается в дозозависимом изменении относительного количества 3-нитротирозина в клеточных лизатах первичных культур HUVEC.

3. Использование рекомбинантного человеческого TGF- $\beta 1$ в концентрации 10 нг/мл в течение 72 часов позволяет достоверно моделировать

эндотелиально-мезенхимальный переход в первичных культурах HUVEC *in vitro*, что подтверждается снижением относительного количества эндотелиальных маркеров (CD 31 и vWF), и повышением относительного количества мезенхимальных (FN и VIM) маркеров EndMT в первичных культурах HUVEC.

4. Воздействие пероксинитрита вызывает повышение относительного количества эндотелиальных маркеров (CD 31 и vWF) и снижение мезенхимальных (FN и VIM) маркеров EndMT в интактных первичных культурах HUVEC.

5. Пероксинитрит в конечных концентрациях 10, 50, 100, 250 и 500 мкМ в течение 2 часов в модели TGF- β 1-индуцированного EndMT вызывает достоверное повышение эндотелиальных (CD 31 и vWF) маркеров и снижение мезенхимальных маркеров (FN и VIM) в клеточных лизатах первичных культур HUVEC.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Данное диссертационное исследование соответствует паспорту научной специальности Биохимия 1.5.4. Медицинские науки, а именно пунктам 10 и 14.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных данных, полученных с использованием адекватных и современных методов исследования с последующей систематизацией и статистической обработкой.

Ключевые положения диссертации были изложены, обсуждены и включены в материалы конференций: Ежегодной научной конференции Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова, посвященной 10-летию науки и технологий (Рязань, 2022); V Национального

конгресса по регенеративной медицине (Москва, 2022); Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы сердечно-сосудистой хирургии» (Курск, 2024); Четвертой международной научно-практической конференции «Экспериментальные и клинические аспекты микроциркуляции и функции эндотелия» (Смоленск, 2024); X Всероссийской научной конференции с международным участием молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста посвященная 175-летию со дня рождения академика И.П. Павлова и 120 — летию со дня получения им Нобелевской премии» (Рязань, 2024); VI Национального конгресса по регенеративной медицине (Санкт-Петербург, 2024); II Рязанского кардиологического конгресса (Рязань, 2024).

Публикации по теме диссертации

По результатам диссертационного исследования опубликовано 11 печатных работ, в том числе 4 статьи в изданиях, включенных в перечень ВАК при Минобрнауки России, из которых 2 — в журналах, входящих в цитатно-аналитические базы данных Scopus и Web of science. Получено 2 патента РФ на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введение, глава 1 — обзор литературы, глава 2 — материалы и методы, глава 3 — результаты исследования и обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы. Диссертация изложена на 124 страницах, иллюстрирована 41 рисунком и 8 таблицами. Список литературы представлен 175 источниками, из которых 9 источников отечественной и 165 источников зарубежной литературы.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность д.м.н., профессору Калинину Р.Е., д.м.н., профессору Сучкову И.А., д.м.н. профессору Якушевой Е.Н., д.м.н., доценту Мжаванадзе Н.Д., д.м.н., доценту Абаленихиной Ю.В., д.м.н., доценту Коротковой Н.В., д.м.н. доценту Щулькину А.В., к.м.н. доценту Никифорову А.А. за всеобъемлющую помощь на всех этапах исследования, а также при подготовке и публикации статей и материалов конференций.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. EndMT: определение, механизм и физиологическая роль

Несмотря на то, что и эндотелиальные, и мезенхимальные клетки имеют мезенхимальное происхождение, они представляют собой два разных клеточных типа. Данные типы различаются по морфологии, фенотипу, физиологическим функциям и последовательностям генов. Пластичность эндотелиальных клеток (ЭК) играет решающую роль в различных процессах развития, а также возникновения патологий. При физиологических и патологических состояниях, таких как эмбриональное развитие, заживление ран, фиброз, воспаление и опухоль, фенотип эндотелиальных клеток может переключаться на мезенхимальный, то есть происходит эндотелиально-мезенхимальный переход (endothelial-mesenchymal transition, EndMT) (Рисунок 1). EndMT был впервые обнаружен Йоханнесом Хольцфретером при изучении раннего эмбрионального развития и дифференцировки в 1939 году [32].

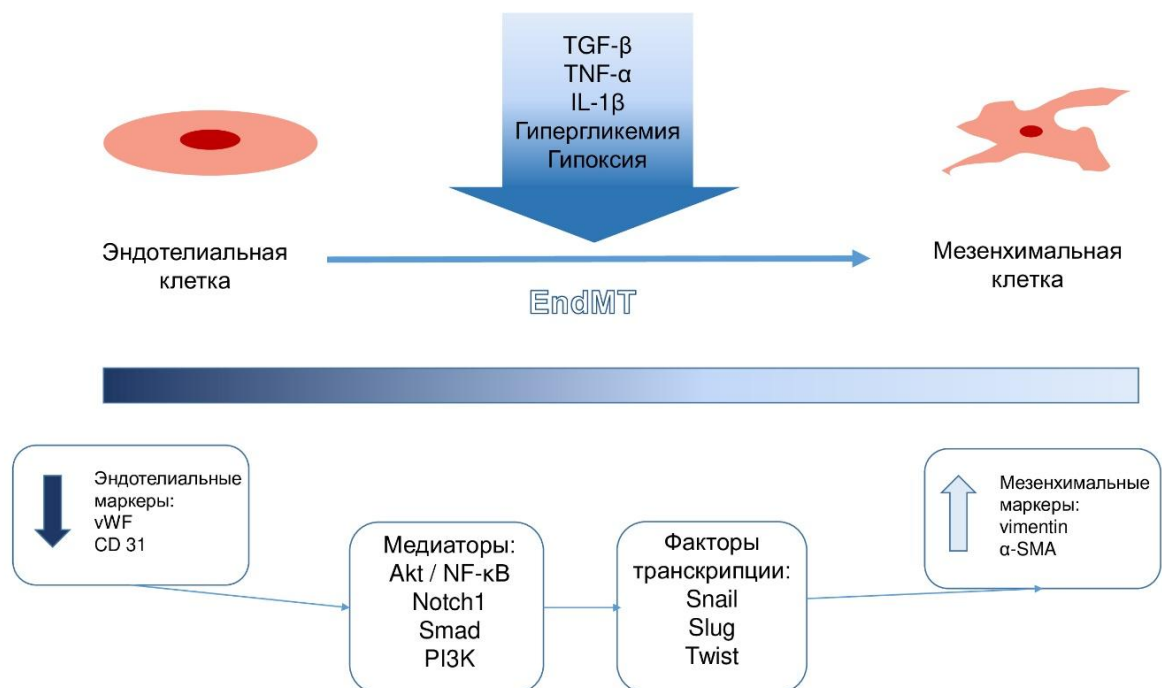


Рисунок 1 – Схема эндотелиально-мезенхимального перехода

Примечание – эндотелиальные клетки, стимулируемые индукторами, например, трансформирующим фактором роста- β (TGF- β), интерлейкином-1 β (IL-1 β), фактором некроза опухоли- α (TNF- α), гипергликемией и гипоксией, подвергаются EndMT [33]

Эндотелиальные клетки выстилают внутреннюю поверхность кровеносных сосудов и играют ключевую роль в поддержании гомеостаза сосудистой системы при воздействии различных раздражителей. Эндотелиоциты в ответ на различные раздражители могут трансформироваться в мезенхимальные клетки, теряя свои первоначальные свойства при таких устойчивых патологических состояниях, как хроническое воспаление, артериальная гипертензия, ожирение и диабет. Эндотелиальная дисфункция может запускать EndMT, который играет важную роль в патогенезе различных заболеваний [34].

Существует три основных направления изучения EndMT: эмбриология, фиброз и метастазирование опухолей. Накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что EndMT лежит в основе многочисленных сосудистых заболеваний. Посредством этого процесса, эндотелиальная клетка может претерпевать значительные изменения. EndMT – это процесс фенотипического перехода эндотелиоцитов, при котором снижается уровень эндотелиальных маркеров (CD31, von Willebrand factor, vWF, VE-cadherin), и увеличивается уровень мезенхимальных маркеров (α -SMA, vimentin). EndMT сопровождается потерей межклеточных контактов и клеточной полярности, что приводит к веретенообразной морфологии и приобретению мигрирующего и инвазивного фенотипа с усилением продукции компонентов экстрацеллюлярного матрикса. В некоторых случаях EndMT приводит к отслоению и миграции происходящих из эндотелиоцитов мезенхимальных клеток в подлежащую ткань [35, 36].

Эндотелиально-мезенхимальный переход представляет собой сложный биологический процесс, который приводит к образованию клеток с мультипотентным потенциалом. EndMT необходим для формирования сердечно-сосудистой системы во время эмбрионального развития. Результаты исследований выявляют связь EndMT с постнатальным возникновением и прогрессированием фиброзных заболеваний и рака.

EndMT был впервые описан в эмбриональном развитии во время ангиогенеза и образования эндокардиальных подушек сердца, предшественников сердечных клапанов. [37] Движение крови по сосудам создает напряжение сдвига

стенки (трение сопротивления), которое вызывает двунаправленный поток – низкое колебательное напряжение сдвига (low oscillatory shear stress, LOSS) и индуцирует трансформацию эндотелиальных клеток. В эмбриональном развитии LOSS индуцирует EndMT в атриовентрикулярном канале, что приводит к накоплению клеток, происходящих из EndMT, в субэндотелиальном пространстве с образованием сердечных подушек, из которых впоследствии развиваются створки клапана [38, 39].

Напряжение сдвига также определяет участок развития атеросклеротического поражения сосудов. Изменение данного параметра распознается механосенсорами эндотелиоцитов, которые преобразуют механическое воздействие в биохимический сигнал, вызывающий активацию сигнальных путей, регулирующих экспрессию генов, функции эндотелия и атерогенных путей [40]. Участки сосудов, расположенные вблизи ветвления и изгибов, склонны к атеросклерозу и подвержены высокому напряжению сдвига, который индуцирует EndMT и воспалительную активацию – движущие силы атеросклероза.

Большинство факторов риска атеросклероза активируют эндотелий, что приводит к образованию хемокинов и цитокинов (например, IL1, IL6, IL8, MCP-1) и молекул адгезии (например, VCAM-1, ICAM-1, E-селектин), которые привлекают и способствуют экстравазации иммунных клеток [41]. Критическим для активации эндотелиальных клеток является переключение между сигналом оксида азота (NO) и сигналом активных форм кислорода (АФК). NO способствует гомеостазу и поддерживает сосудистую стенку в состоянии покоя за счет ингибирования секреции провоспалительных цитокинов, экстравазации иммунных клеток, пролиферации гладкомышечных клеток (smooth muscle cell, SMC), тромбоза, тогда как АФК индуцирует передачу сигналов NFκB (Nuclear factor κB, NFκB), основного регулятора воспаления. Состояние окислительного стресса является обычным явлением, лежащим в основе механизмов дисфункции ЭК в ответ на биохимические и биомеханические патофизиологические стимулы. При активации эндотелий приобретает провоспалительное состояние и

становится более проницаемым, способствуя накоплению лейкоцитов и липидов в интима артерии, что приводит к образованию пенистых клеток и образованию жировой полосы – отличительных признаков развития атеросклероза [42].

Воспалительная передача сигналов синергична с TGF- β в индукции EndMT, также воспалительный стресс усугубляет прогрессирование атеросклероза у мышей [43]. Провоспалительные цитокины (например, IL-1 β и TNF- α) активируют фактор транскрипции NF κ B, что приводит к повышенной продукции TGF- β 1 и TGF- β 2, основного индуктора EndMT. Помимо конвергенции воспаления с передачей сигналов TGF- β , провоспалительные цитокины также могут индуцировать EndMT независимым от TGF- β образом. EndMT, индуцированный воспалением, основан на индукции Snail с помощью NF- κ B, основных регуляторов транскрипции EndMT. Точный путь EndMT, индуцированного воспалением, еще предстоит выяснить, и то, как он сходится или отклоняется от канонического TGF- β -индуцированного EndMT, требует дальнейшего изучения [44].

При повышенной нагрузке давлением миокард приспособляется и изменяет свою структуру и функцию. Эти изменения сопровождаются серией сложных клеточных и молекулярных перестроек, которые приводят к прогрессированию компенсаторной гипертрофии в сердечную недостаточность [45]. Морфологические изменения включают гипертрофию кардиомиоцитов, повышение синтеза межклеточного вещества, что ведет к нарушению динамического баланса внеклеточного матрикса, влияющего на васкуляризацию, синтез и деградацию коллагена [36, 46]. В компенсаторной стадии гипертрофии эти изменения позволяют параллельно увеличивать рост кардиомиоцитов и отложение коллагена. Развитие процесса гипертрофии приводит к апоптозу кардиомиоцитов, избыточному отложению коллагена для замены некротизированных или апоптотических клеток, изменению профиля факторов роста, созданию антиангиогенной среды. Это ведет к нарушению микроциркуляторного русла и обусловленной этим гибелью кардиомиоцитов и запускает активацию TGF- β . Повышенное содержание коллагена в сердце тесно

связано с передачей сигналов TGF- β , что делает его перспективной мишенью для лечения сердечной недостаточности [47].

Сердечный фиброз тесно связан с множеством сердечно-сосудистых заболеваний, характеризующихся отложением компонентов внеклеточного матрикса (extracellular matrix, ECM) [48]. Процесс фиброза заключается в пролиферации фибробластов и их последующей дифференцировки в миофибробласты, которая приводит к повышенной выработке α -гладкомышечного актина (α -SMA) и продукции белков ECM, таких как коллаген I, III, VI и V [49]. EndMT также является источником фибробластов и эндотелиальных клеток, дающих начало миофибробластам, связанным с фиброзными заболеваниями. Этот переход способствует миграции миофибробластов в интерстициальные ткани, приводящих к фиброзу.

EndMT играет фундаментальную роль в процессе эмбриогенеза сердца и сосудов в норме, и все больше данных указывает на его участие в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [50].

1.2. Маркеры EndMT

Ключевые маркеры эндотелиального профиля:

1) Молекула клеточной адгезии тромбоцитов и эндотелиоцитов-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1 или CD 31) (130 кДа) осуществляет барьерную функцию эндотелия путем образования межклеточных контактов, а также участвует в трансэндотелиальной миграции лейкоцитов, ангиогенезе и активации интегринов [51]. PECAM-1 локализуется на поверхности тромбоцитов и лейкоцитов, концентрируется в межклеточных соединениях эндотелиальных клеток сосудов [52] (Рисунок 2).

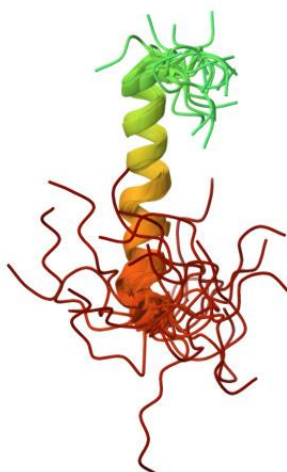


Рисунок 2 – Структурная формула цитоплазматического домена PECAM-1 (CD31) (цит. по URL: <https://www.rcsb.org/structure/2KY5>)

2) Фактор фон Виллебранда (von Willebrand factor, VWF) (300 кДа) представляет собой гликопротеин крови, участвующий в процессах воспаления и гемостаза, в частности, адгезии тромбоцитов. Основной функцией фактора фон Виллебранда является адгезия тромбоцитов к местам повреждения сосудов путем связывания со специфическими гликопротеинами мембраны тромбоцитов и с компонентами соединительной ткани, также связывание с другими белками, в частности с фактором VIII, который важен для адгезии тромбоцитов к раневым участкам [53] (Рисунок 3).

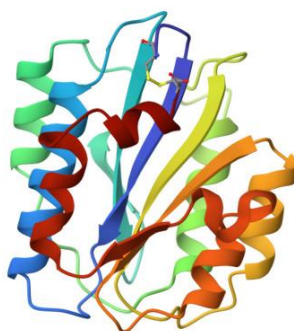


Рисунок 3 – Структурная формула мультимерного белка плазмы крови фактора фон Виллебранда (vWF) (цит. по URL: <https://www.rcsb.org/structure/1AO3>)

Основные маркеры мезенхимального профиля:

1) Кадгерин сосудистого эндотелия (VE-cadherin, VE-cad) (120 кДа) играет важную роль в поддержании целостности межклеточных контактов и является основным фактором, определяющим проницаемость эндотелия. VE-кадгерин необходим для поддержания барьерной функции эндотелия. Исследования с использованием блокирующих антител к VE-кадгерину показали, что они повышают проницаемость монослоя культивируемых клеток [54, 55] (Рисунок 4) [54].

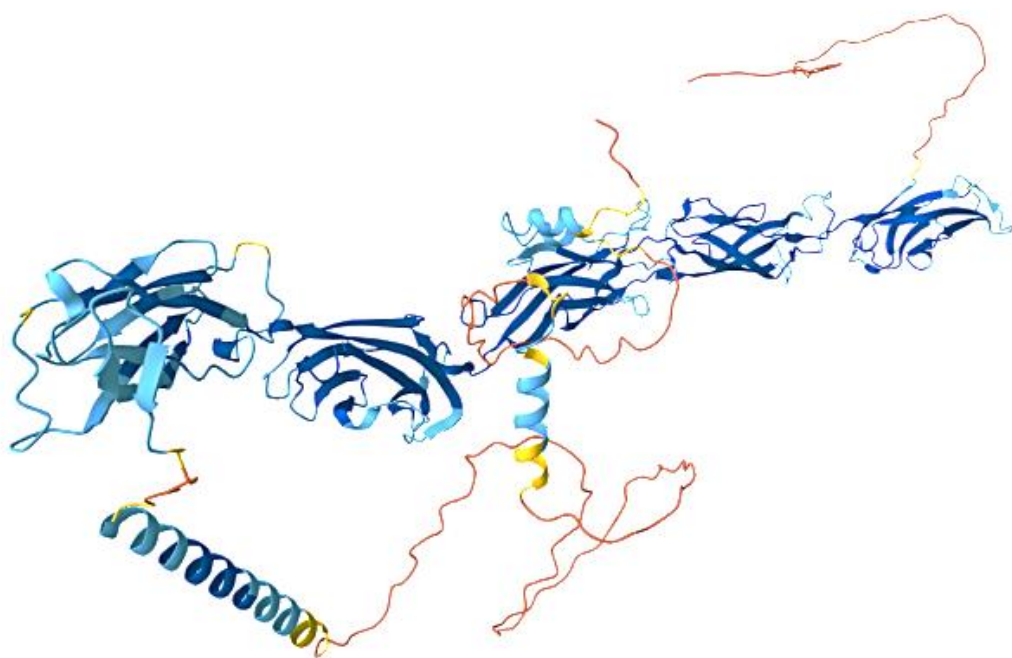


Рисунок 4 – Структурная формула VE-кадгерина человека (цит. по URL: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P33151/entry#structure>)

2) Виментин (Vimentin, VIM) (57 кДа) представляет собой белок, который является основным компонентом цитоскелета мезенхимальных клеток и играет значимую роль в поддержании и закреплении положения органелл в цитоплазме, формы клеток, целостности цитоплазмы и стабилизации цитоскелетных взаимодействий [56]. Виментин является основным белком промежуточных филаментов (ПФ), обнаруженных в мезенхимальных клетках (Рисунок 5).



Рисунок 5 – Структурная формула белка промежуточных филаментов vimentin (VIM) (цит. по URL: <https://www.rcsb.org/structure/1GK4>)

3) Фибронектин (Fibronectin, FN) высокомолекулярный (440–530 кДа) гликопротеин внеклеточного матрикса, который связывается с мембранными рецепторными белками – интегринами, а также с другими белками, например, коллагеном, фибрином и гепарансульфатными протеогликанами. Фибронектин существует в виде белкового димера, состоящего из двух практически идентичных мономеров, соединенных парой дисульфидных связей. Функции фибронектина весьма обширны: участвует в клеточной адгезии, миграции и дифференцировке клеток, а также играет важную роль в заживлении ран [57] (Рисунок 6).

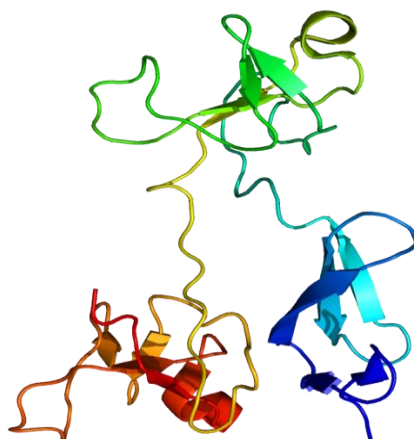


Рисунок 6 – Структурная формула гликопротеина внеклеточного матрикса Fibronectin (FN) (цит. по URL: <https://www.rcsb.org/structure/1E88>)

В качестве потенциальных маркеров EndMT, которые могут играть важную роль в данном процессе, рассматриваются ингибитор активации плазминогена 1 типа (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) и эндотелиальные рецепторы протеина С (endothelial cell protein C receptor, EPCR).

PAI-1 в основном вырабатывается эндотелием, но также может секретироваться ГМК и клетками жировой ткани [58]. Основная функция PAI-1 заключается в ингибировании активатора плазминогена урокиназы (uPA), фермента, ответственного за расщепление плазминогена с образованием пламина. Пламин опосредует деградацию внеклеточного матрикса непосредственно, либо в сочетании с матриксными металлопротеиназами. В этом сценарии PAI-1 ингибирует uPA, предотвращая образование пламина. Дополнительное ингибирование опосредовано связыванием PAI-1 с комплексом рецепторов uPA/uPA, что приводит к деградации последнего [59]. Кроме того, в настоящее время PAI-1 рассматривается в качестве маркера клеточного старения [60] (сенесценции).

Эндотелиальный рецептор протеина С (Endothelial protein C receptor, EPCR) – трансмембранный гликопротеин, присутствующий на поверхности эндотелиальных клеток артерий, вен и капилляров в легких, сердце и коже, а также синтезируемый другими типами клеток, включая ГМК. Является важным компонентом антикоагулянтной системы протеина С. Также показано, что EPCR играет решающую роль в опосредовании передачи цитопротекторных сигналов, индуцированных активированным протеином С [61].

Таким образом, помимо всеобщих признанных существуют и прочие потенциальные маркеры эндотелиально-мезенхимального перехода, включая вышеуказанные PAI-1 и EPCR, продукция которых характерна как для эндотелиальных, так и гладкомышечных клеток. Роль данных факторов в процессах EndMT является объектом будущих исследований.

1.3. Индукторы EndMT

Ключевым индуктором является трансформирующий фактор роста- β (transforming growth factor- β , TGF- β) (Рисунок 7) [62]. Члены семейства TGF- β можно разделить на подсемейства в соответствии с их последовательностями и функциональным сходством: TGF- β , активины и узловые белки, костные морфогенетические белки (BMP2-7), факторы роста дифференцировки (growth differentiation factors, GDFs) и антимюллеров гормон (anti-Müllerian hormone, AMH).

TGF- β имеет три изоформы, TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3, которые могут индуцировать EndMT *in vitro*: TGF- β 2 необходим для индукции EndMT во время развития сердца; при атеросклерозе экспрессируются все изоформы TGF- β с выраженной пространственной и клеточной вариабельностью [63, 35]. Недавно, Sabbineni et al. (2018) показали, что в дермальных микрососудистых ЭК человека (HMEC) TGF- β 2 более эффективно, чем TGF- β 1 или TGF- β 3, индуцирует экспрессию мезенхимальных факторов транскрипции Snail и FoxC2. Воздействие TGF- β 1 и TGF- β 3 индуцировало экспрессию TGF- β 2, что позволяет предположить, что они могут действовать непрямым образом [64]. Medici et al. (2010) показали, что как TGF- β 2, так и BMP4 индуцируют EndMT в эндотелиоцитах пупочной вены человека (HUVEC) и микрососудистых ЭК сосудов кожи человека (HСMEC) ALK2- и T β RI-зависимым образом [65].



Рисунок 7 – Структурная формула трансформирующего фактора роста- β (TGF- β) (цит. по URL: <https://www.rcsb.org/structure/1KLA>)

Передача сигналов (TGF β) занимает центральное место в EndMT, хотя передача сигналов Wnt/ β -catenin и Notch также может вносить вклад в определенных условиях. Общей тенденцией является повышенная экспрессия факторов транскрипции Snail, Slug, Twist, LEF-1, ZEB1 и ZEB2, которые подавляют экспрессию эндотелиальных и/или активируют экспрессию мезенхимальных генов. Активация передачи сигналов TGF- β стимулирует фосфорилирование Smad2/3, а также экспрессию EndMT-стимулирующих транскрипционных факторов, таких как Snail1 [66].

С момента открытия TGF- β 1 в начале 1980-х годов благодаря его способности индуцировать рост нормальных клеток почек крыс в мягком агаре, было идентифицировано и охарактеризовано 33 гена человека, кодирующих полипептидные члены, принадлежащие к семейству TGF- β [67].

1.4. Сигнальные пути EndMT

Рассмотрим механизм передачи сигналов TGF- β для регулирования экспрессии генов. Процесс жестко контролируется на нескольких уровнях, включая экспрессию лигандов, активацию и продукцию рецепторов. Члены семейства TGF- β запускают биологические процессы, индуцируя образование рецепторных комплексов клеточной поверхности, несущих внутреннюю активность серин/треонин киназы. В ответ на внеклеточные стимулы (т.е. воспаление и гипоксию) TGF- β транскрибируются и секретируются клетками в неактивной димерной форме. TGF- β неактивны из-за нековалентного взаимодействия между аминоконцевой пропептидной последовательностью, известной как латентно-ассоциированный пептид (LAP), и карбокси-концом зрелого пептида TGF- β . Когда активируются специфические ферменты, такие как сериновая протеаза, плазмин и фурин, пропептид расщепляется, в результате чего высвобождается TGF- β в зрелой и активной форме, в виде гомо- и гетеродимеров [68]. Секретируемый димерный лиганд связывается с гетеротетрамерным

комплексом киназных рецепторов I и II типа, расположенных на клеточной мембране. После связывания с лигандом индуцируются рецепторы II типа, которые фосфорилируют и, тем самым активируют рецепторы I типа. Последние, в свою очередь, активируют путем прямого фосфорилирования по концевым остаткам серина белка SMAD4 (Mothers against decapentaplegic homolog 4). Два активированных рецептором SMAD4 образуют тримерный комплекс с белком – посредником; комплекс транслоцируется в ядро и участвует во взаимодействиях с секвенс-специфическими факторами транскрипции, корепрессорами и коактиваторами регуляторных последовательностей генов. Таким образом, осуществляется лиганд-индуцированная активация или репрессия чувствительных генов-мишеней. SMAD4 отвечает за передачу сигналов, обеспечивающих регуляцию роста и дифференцировки клеток [62, 69].

Передачу сигналов TGF- β можно разделить на SMAD-зависимый и не-SMAD-зависимый путь [70]. Все больше данных демонстрирует роль сигнального пути TGF- β в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки, адгезии, миграции и апоптоза не только как в эмбриональном развитии, так и в патологии заболеваний человека (Таблица 1).

Сигнальный путь TGF- β является каноническим путем, модулирующим EndMT, который, взаимодействует с другими путями, включая пути фактора роста фибробластов (FGF), Notch и пути костного морфогенетического белка (BMP).

Путь Notch является ключевым сигналом при фиброзе миокарда, способствуя экспрессии факторов транскрипции Snail, Slug и Zeb1 в процессе EndMT. Взаимодействие Notch и Slug имеет решающее значение для ингибирования активации VE-кадгерина и β -катенина. Сверхэкспрессия Notch приводит к снижению уровня VE-кадгерина в эндотелиальных клетках, и впоследствии инициируется процесс EndMT. Сигнальный путь Notch включает 4 рецептора (Notch1–4) и 5 лигандов (Delta-like-1, 3, 4 и Jagged1–2). Связывание рецептора Notch с лигандом генерирует внутриклеточный домен Notch (NICD), который транслоцируется в ядро, где NICD связывается с транскрипционным

фактором RBPK/CSL, чтобы регулировать экспрессию гена-мишени и, таким образом, определять судьбу клетки [71].

Многочисленные исследования показали, что индуцируемый гипоксией фактор-1 α (HIF-1 α) является ключевой молекулой в регуляции EndMT в различных моделях гипоксии, как *in vitro*, так и *in vivo*. В физиологических условиях HIF-1 α катализируется и разлагается пролилгидроксилазой (например, PHD2, PHD3). Напротив, деградация тормозится при различных заболеваниях. В качестве фактора транскрипции HIF-1 α напрямую взаимодействует с промотором элемента гипоксического ответа, регулируя экспрессию генов, связанных с EndMT, таких как Snail, Slug и Twist. Кроме того, HIF-1 α индуцирует продукцию интерстициальных маркеров, таких как виментин, N-кадгерин, которые необходимы для HDAC3-опосредованного образования комплекса гистон-метилтрансферазы. Также показано, что гипоксия также индуцирует процесс EndMT через сигнальные пути TGF- β /Smad в модели ремоделирования сердца. Исследования на различных экспериментальных моделях животных *in vivo* выявили эффект индуцированной гипоксией EndMT, связанный с типичными изменениями характеристик клеток при гипертензии легочной артерии. Наблюдалось усиленное фосфорилирование Smad1/5 и Smad2, и эти эффекты ингибируются за счет специфического блокирования ALK1 или ALK5. Сигнальные пути HIF-1 α и TGF- β /Smad синергически участвуют в индуцированной гипоксией EndMT посредством прямой индукции Snail и аутокринной стимуляции TGF- β в желудочковых кардиомиоцитах [72].

Таблица 1 – Основные сигнальные пути EndMT [46, 73–75]

Сигнальный путь	Основные молекулы/рецепторы	Роль в EndMT	Взаимодействие с другими путями
TGF- β /SMAD	TGF- β 1/2/3, SMAD2/3	Ключевой индуктор EndMT: подавляет эндотелиальные и активирует мезенхимальные маркеры	Взаимодействует с Notch, BMP, MAPK

Продолжение Таблицы 1

Неканонические пути TGF- β	MAPK, PI3K/AKT, Rho/ROCK	Усиливают EndMT независимо от SMAD, регулируют цитоскелет и выживаемость	Кросс-активация с Wnt, Notch
Notch	Notch1–4, Jagged1/2, NICD	Способствует потере эндотелиального фенотипа, усиливает синтез мезенхимальных маркеров	Синергия с TGF- β , регуляция через Slug
Wnt/ β -катенин	Wnt, β -катенин	Активация приводит к мезенхимальной трансформации при гипоксии и воспалении	Кросс-активация с TGF- β , BMP
BMP	BMP2/6/9, BMPR2, SMAD1/5/8	Может как стимулировать, так и ингибировать EndMT в зависимости от контекста	Балансирует с TGF- β , влияет на кальцификацию
ATF4/ p75NTR/IL-8	ATF4, p75NTR, IL-8	Новый путь, индуцируемый химическими агентами, важен для фиброза и опухолей	Мало изучено, потенциальная мишень для терапии
Некодирующие РНК	miR-122, miR-374b, H19, MALAT1	Регулируют экспрессию генов EndMT, влияют на прогрессирование атеросклероза и фиброза	Взаимодействуют с TGF- β , Wnt, Notch

Помимо этого, в регуляции EndMT играют важную роль фактор некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor- α , TNF- α) [76] [77], а также высокие концентрации глюкозы. TGF- β представляется наиболее изученным и часто используемым в экспериментальных моделях индуктором EndMT.

Фактор некроза опухоли- α , провоспалительный цитокин, играет важную роль в регуляции различных клеточных взаимодействий. В ЭК ответы TNF- α вызываются связыванием одного из двух рецепторов TNF I или II типа, что позволяет активировать факторы транскрипции, такие как ядерный фактор каппа NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). Это индуцирует транскрипцию множества генов, таких как молекула адгезии

сосудистых клеток 1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) и молекула межклеточной адгезии 1 (PECAM-1). TNF- α также индуцирует EndMT посредством активации множества сигнальных путей в различных типах ЭК [76].

Другим важным индуктором EndMT является интерлейкин-1 β - провоспалительный цитокин. Изменения фенотипа эндотелиоцитов были впервые продемонстрированы в обработанных IL-1 β кожных микрососудистых ЭК человека, претерпевающих морфологические изменения и реорганизацию цитоскелета, снижение уровня типичных эндотелиальных маркеров, таких как фактор фон Виллебранда (vWF) и CD31 [77]. В исследовании Maleszewska М. и соавт. (2015) показано, что длительное воздействие IL-1 β на эндотелиоциты микрососудов кожи человека индуцирует продукцию мезенхимальных маркеров, таких как α -SMA, коллаген I типа и кальпонин, и ингибирует синтез vWF. Авторы сообщили, что молекулярный механизм, лежащий в основе индуцированного IL-1 β EndMT, включает повышенную продукцию белка SM22 α , кодируемого промотором гена белка трансгелина TAGLN (Transgelin). SM22 α — это белок, специфичный для гладких мышц, который содержится в гладких, сердечных и скелетных мышцах, начиная с ранних этапов эмбриогенеза, в позднем эмбриогенезе и у взрослых. Результаты Cho J. G. с соавт. 2018 исследования продемонстрировали эпигенетическую регуляцию TAGLN через EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2), который, интегрируя передачу сигналов IL-1 β и TGF β 2 на уровне регуляции TAGLN, способствует прогрессированию процесса трансдифференцировки EndMT [78, 79].

TGF- β 2 и IL-1 β синергетически индуцируют EndMT за счет увеличения синтеза мезенхимальных маркеров при одновременном снижении синтеза эндотелиальных маркеров в эндотелиальных клетках микрососудов пищевода человека и ЭК человека пупочной вены (HUVEC). Комбинация факторов TNF- α , IL-1 β и TGF β 1 также индуцирует EndMT в ЭК легочной артерии, при этом клетки EndMT демонстрируют морфологические изменения и наличие эндотелиальных и мезенхимальных маркеров [80].

В ряде исследований сообщалось, что комбинация вышеуказанных цитокинов более эффективна в отношении индукции EndMT, нежели действие одного из них [81]. Также было показано, что влияние комбинации $\text{TGF}\beta 1$, $\text{IL-1}\beta$ и $\text{TNF-}\alpha$ в эндотелиальных клетках микрососудов кишечника человека способно индуцировать EndMT опосредовано - через действие фактора транскрипции Sp1 (specificity factor 1), являющегося ключевым регулятором транскрипции генов, связанных с EndMT.

$\text{TGF-}\beta 2$ и $\text{IL-1}\beta$ синергетически индуцируют EndMT за счет увеличения синтеза мезенхимальных маркеров при одновременном снижении синтеза эндотелиальных маркеров в эндотелиальных клетках микрососудов пищевода человека и ЭК человека пупочной вены (HUVEC). Комбинация факторов $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ и $\text{TGF}\beta 1$ также индуцирует EndMT в ЭК легочной артерии, при этом клетки EndMT демонстрируют морфологические изменения и продукцию эндотелиальных и мезенхимальных маркеров [80]

В ряде исследований сообщалось, что комбинация вышеуказанных цитокинов более эффективна в отношении индукции EndMT, нежели действие одного из них. Также было показано, что влияние комбинации $\text{TGF}\beta 1$, $\text{IL-1}\beta$ и $\text{TNF-}\alpha$ в эндотелиальных клетках микрососудов кишечника человека способно индуцировать EndMT опосредовано - через действие фактора транскрипции Sp1 (specificity factor 1), являющегося ключевым регулятором транскрипции генов, связанных с EndMT.

Эндотелиальные клетки активно участвуют в регуляции иммунного ответа на различные раздражители, сопровождающиеся воспалением. Однако передача клеточных сигналов EndMT, вызванных воспалением, остается недостаточно исследованной. Тем не менее, молекулярные механизмы, лежащие в основе EndMT, вызванного воспалением, постепенно были установлены на основе наблюдений за процессом эпителиально-мезенхимального перехода (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT), который относительно хорошо изучен в отношении воспаления [46, 46]. В настоящее время известно, что EndMT, индуцированный

воспалением, как и EMT, регулируется преимущественно путем TGF- β , а также другими путями [83].

EndMT, связанный с иммунным ответом, может быть индуцирован провоспалительными цитокинами TNF- α , IL-1 β и их комбинацией. Также EndMT, вызванный воспалением, характеризуется потерей нормального фенотипа ЭК и усилением мезенхимальных характеристик, а эндотелиальные/мезенхимальные маркеры контролируются медиаторами EndMT: ZEB1 (Zinc finger E-box-binding homeobox 1), β -катенин, Akt / NF- κ B, Snail, slug, Notch1, костный морфогенетический белок (BMP)-4, специфический белок 1 (specificity protein 1, Sp1), фосфоинозитид-3-киназа (phosphoinositide 3-kinase (PI3K) и энхансер гомолога 2 zeste (Enhancer of zeste homolog 2, EZH2) [84, 85].

Исследование эндотелиальной дисфункции, вызванной метаболическими нарушениями, такими как ожирение, гипергликемия и дислипидемия, показали связь с индукцией EndMT. Исследования продемонстрировали, что высокий уровень глюкозы индуцирует EndMT посредством активации путей Smad2/3, Snail, Rho-ассоциированной киназы 1 (rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 1, ROCK1), фактора сывороточного ответа (serum response factor, SRF) [86] и киназами, регулируемые внеклеточными сигналами (extracellular signal-regulated kinases, ERK) в ЭК клубочков [87, 88]. Это приводит к повышению уровня мезенхимальных маркеров, таких как α -SMA, коллаген I типа, фибронектин, виментин, а также к снижению уровня эндотелиальных маркеров (CD31 и VE-кадгерин) в различных типах ЭК.

1.5. Ингибиторы EndMT

Обработка эндотелиальных клеток лактатом нарушает функцию эндотелиальных клеток и индуцирует мезенхимоподобную функцию после гипоксии путем активации пути TGF- β /Smad2. *In vitro* обнаружено, что лактат

способствует индуцированной гипоксией активации передачи сигналов EndoMT и TGF- β /Smad2 в эндотелиальных клетках [89].

В отличие от индукторов, по эндогенным ингибиторам EndMT, данных недостаточно. Фактор роста фибробластов (fibroblast growth factors, FGF) является одним из наиболее изученных эндогенных ингибиторов EndMT. Передача сигналов FGF в ЭК индуцирует экспрессию нескольких микроРНК, которые снижают уровень киназы, подобной рецептору активина А типа II, (transforming growth factor beta receptor 1 или activin A receptor type II-like kinase, ALK5) [90]. Также, передача сигналов FGF прямо противодействует ALK5-индуцированной экспрессии мезенхимальных генов Ras/MEK1-зависимым образом [90].

Большинство BMP продвигают EndMT, но BMP7, является отрицательным регулятором EndMT. BMP7 блокирует TGF β -индуцированный EndMT посредством регуляции активности промотора VE-кадгерина, однако механизм передачи остается мало изученным [91].

У ряда лекарственных препаратов была установлена способность к ингибированию EndMT. Было показано, что противодиабетический препарат линаглиптин – ингибитор дипептидилпептидазы-4 (DPP-4), нарушает его взаимодействие с интегрином β 1 и блокирует EndMT, индуцированный TGF- β 2 [92] [93]. Мацитентан, ингибитор рецептора эндотелина-1, нарушает EndMT, индуцированный либо эндотелином-1, либо TGF- β 1 [94]. Каллистатин блокирует TGF - β -индуцированный EndMT за счет усиления эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) и дифференциальной регуляции miR-21 [95]. Спиронолактон, блокатор альдостероновых рецепторов, также может ингибировать TGF - β -индуцированный EndMT, контролируя экспрессию Notch1 [96]. Лозартан, ингибитор рецептора ангиотензина II типа 1, нарушает EndMT, блокируя передачу сигналов TGF- β [97].

Альтернативой системному подходу к ингибированию передачи сигналов TGF β является разработка эндотелиально-таргетной терапии. Недавние достижения в наномедицине привели к открытию нескольких классов наночастиц, способных воздействовать на различные органы. Одна такая терапия, специально

нацеленная на печень, была недавно одобрена Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA). Другой класс наночастиц, обозначенный как 7C1, нацелен на эндотелий сосудов крупного и среднего размера [69].

1.6. Моделирование эндотелиально-мезенхимального перехода в экспериментальных условиях

EndMT представляет собой сложный процесс клеточной дифференцировки. EndMT начинается с ослабления межклеточных контактов эндотелиальных клеток, деградации базальной мембраны и миграции клеток в периваскулярную область, т. е. происходит моделирование фенотипа клеток сосудистой стенки. В адаптивных условиях регенерации образовавшиеся мезенхимальные клетки продуцируют внеклеточный матрикс и способствуют поддержанию целостности тканей, а в дезадаптивных (патологических) условиях данные мезенхимальные клетки вызывают фиброз и потерю функции органа. Индукция эндотелиальной мезенхимы в постнатальном периоде развития может стать механизмом адаптации к физиологическим условиям или причиной дисфункциональных реакций организма на заболевания.

Моделирование эндотелиально-мезенхимального перехода в экспериментальных условиях актуально для понимания клеточной пластичности и определения таргетной терапии хронических заболеваний. Воссоздание этого фенотипического переключателя в лабораторных условиях, позволяет составить карту основных сигнальных путей, оценить прогрессирование заболевания и предположить новые методы лечения. Экспериментальные модели необходимы для выяснения того, как эндотелиальные клетки теряют специфические маркеры и приобретают мезенхимальные свойства.

В моделировании EndMT можно выделить следующие направления (Рисунок 8):

1. in vitro

2. *in vivo*
3. *in silico*

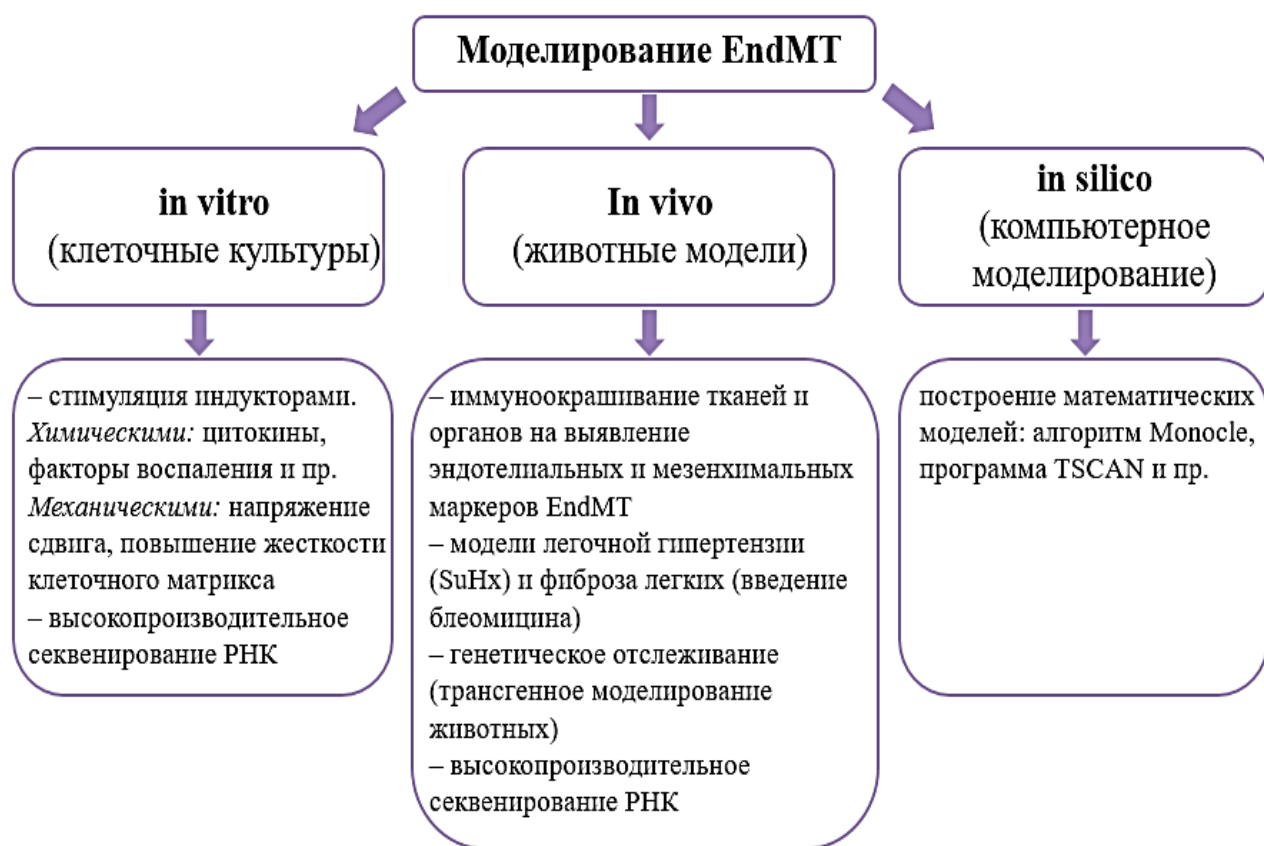


Рисунок 8 – Моделирование EndMT в биологических исследованиях [98–100]

Рассмотрим современные модели, используемые для изучения EndMT *in vitro*. В основном, клеточные культуры подвергают воздействию индукторов. Наиболее распространенным в исследованиях является использование цитокинов семейства TGF- β . Также в литературных данных встречается моделирование EndMT при помощи воспалительных факторов IL-1 β или TNF- α .

Например, Цзинь Ма с соавторами культивировали эндотелиальные клетки MS-1 и 2H11 в питательной среде с 10% FBS, а затем обрабатывали рекомбинантным человеческим TGF- β 2 (1 нг/мл) в течение 3 дней, для оценки влияния TGF- β на EndMT [101].

В исследовании Fernanda Ursoli Ferreira et al изучали молекулярные механизмы и сигнальные пути EndMT в макрососудистых эндотелиальных

клетках из разных источников (эндотелиальные клетки коронарных артерий, CAECs; первичные эндотелиальные клетки аорты, PAECs; эндотелиальные клетки пупочной вены человека, HUVECs; и эндотелиальные клетки лёгочных артерий человека, HPAECs) и стимулировали их 10 нг/мл TGF- β 2 в течение 5 суток [102].

Ghosh et al. (2012) исследовали молекулярные основы EndMT в эндотелиальных клетках сердца мышей (MCECs) в ответ на TGF- β 2. В течение 7 суток инкубации MCEC с TGF- β 2 было выявлено, что уровни экспрессии определённых микроРНК, которые нарушаются при различных сердечно-сосудистых заболеваниях, изменяются во время TGF- β 2-индуцированной EndMT в сердечных ECs (MCECs) мышей. После стимуляции TGF- β 2 miR-125b, Let7c, Let-7g, miR-21, miR-30b и miR-195 повышались, а miR-122a, miR-127, miR-196 и miR-375 понижались [103].

Цзыцзе Ван и соавторы изучали роль TGF- β 1-индуцированного EndMT в развитии интерстициального фиброза пересаженной почки. Для оценки влияния TGF- β 1 на HUVEC, клетки на ночь оставляли в среде без добавления сыворотки, а затем обрабатывали 0,5, 1,0, 2,0, 5,0 и 10,0 нг/мл TGF- β 1 в течение 48 часов или 5 нг/мл TGF- β 1 в течение 1, 6, 12, 24, 48 и 72 часов [104].

Поскольку стандартизация моделей и маркеров EndMT отсутствует, зачастую, полученные в разных модельных системах и лабораториях данные плохо сопоставимы. Также при определении эндотелиально-мезенхимального перехода необходимо учитывать происхождение эндотелиоцитов и их значительную гетерогенность. Представленные лабораторные протоколы весьма вариативны по условиям, срокам экспозиции и концентрациям индукторов.

Регуляция EndMT может стать ключом для восстановления, ремоделирования или регенерации тканей и органов. Знание механизмов развития EndMT можно расширить благодаря появлению новых эффективных моделей *in vitro*. Лабораторные исследования дополняют и расширяют результаты *in vivo* и могут определить гипотезы для дальнейшего изучения данного процесса.

1.7. Нитрозативный стресс

Нитрозативный стресс, как важное нарушение метаболизма оксида азота, тесно связан с сердечно-сосудистыми заболеваниями, такими как ишемия/реперфузионное повреждение миокарда, аневризма аорты, сердечная недостаточность, гипертония и атеросклероз. В физиологических условиях низкие уровни нитрозативного стресса можно обнаружить практически во всех клетках *in vivo*, таких как кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, фибробласты, мезенхимальные стволовые клетки и гладкомышечные клетки сосудов. Однако, недостаточно данных о роли нитрозативного стресса при патологических состояниях и о том, в какой степени нитрозативный стресс изменяет структуру и функцию клеток [105].

Нитрозативный стресс представляет собой дисбаланс между образованием активных форм азота и их элиминацией различными восстанавливающими или антиоксидантными системами, которые разрушают реакционноспособные промежуточные соединения и предотвращают или устраняют возникающие повреждения [106].

Нитрозативный стресс тесно связан с окислительным стрессом. Активные формы кислорода (АФК), такие как супероксид-анион (O_2^-), гидроксильный радикал (ОН), перекись водорода (H_2O_2), которые участвуют в окислительном стрессе, перекрываются с путями образования и поглощения активных форм азота и взаимно регулируют друг друга [107].

Активные формы азота образуются при аномальном повышении уровня оксида азота (NO), вырабатываемого индуцибельной синтазой оксида азота (iNOS) и/или несвязанной эндотелиальной синтазой оксида азота (eNOS). Для их образования также необходимо присутствие высоких концентраций супероксид-анионов (O_2^-). АФА реагируют в три раза быстрее, чем O_2^- с другими молекулами и имеют более длительный средний период полураспада. Они вызывают необратимые повреждения клеточных мембран, белков, митохондрий, эндоплазматической сети, нуклеиновых кислот и ферментов, изменяя их

активность и приводя к некрозу и гибели клеток. Активные формы азота включают пероксинитрит (ONOO^-) (Рисунок 9), диоксид азота ($\bullet\text{NO}_2$), пероксиазотистую кислоту (HNO_3), триоксид диазота (N_2O_3), нитроксил (HNO), пероксиазотистую кислоту (ONOOH), пероксинитрат (O_2NOO^-), пероксиазотную кислоту (O_2NOOH), катион нитрозония (NO^+), нитрат (NO_3^-), нитрит (NO_2^-) и нитроксиланион (NO^-). В нормальных условиях АФА служат важными посредниками в клеточной физиологии и генерируются множеством биохимических процессов [108]. АФА и окислительный стресс нарушают клеточный окислительно-восстановительный баланс. Основными мишенями АФА являются клеточная ДНК, белки и липиды. АФА могут оказывать свое действие как потенциальные нитрозилирующие и окислительные агенты.

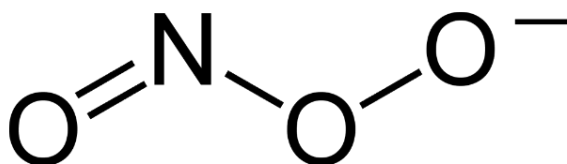


Рисунок 9 – Химическая структура пероксинитрита ONOO^-

Нитрозативный стресс может способствовать нитрозилированию белка тирозина, что приводит к перекисному окислению липидов, разрыву цепей ДНК, повреждению клеточных мембран, инактивации функциональных ферментов и активации каскадных сигнальных реакций на гибель клеток. Посредством перечисленных биологических реакций, нитрозативный стресс влияет на заболевания посредством различных процессов, таких как передача сигнала в клетках, митохондриальный энергетический метаболизм, транскрипция рибонуклеиновой кислоты, посттрансляционная модификация белка и функционирование ионных каналов [109].

Источники внутриклеточного оксидативного и нитрозативного стресса [110]:

- НАДФН-оксидаза

- Система ксантиноксидаза/дегидрогеназа (XO/XDH)
- NO-синтазы (NOS)
- Разрыв ферментативной цепи митохондрий
- Нарушение обмена железа и кальция.

1.8. Синтез оксида азота (II)

NO ферментативно синтезируется семейством белков NO-синтазы (NOS) путем превращения L-аргинина в цитруллин. Эта реакция катализируется ферментом синтазой оксида азота (NOS) в присутствии кислорода и никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФН).

Существуют три различные изоформы белков NOS: нейрональная NOS (nNOS) (кодируемая NOS1), индуцируемая NOS (iNOS) (кодируемая NOS2), которая сначала была идентифицирована в макрофагах, а затем в других клетках, включая гепатоциты, которая повышается под действием провоспалительных цитокинов и/или липополисахаридов (ЛПС) и способна генерировать низкие уровни NO по сравнению с другими изоформами NOS, и NOS (eNOS) (кодируемая NOS3) которая связывается с плазматическими мембранами и, как известно, сильно активируется при проникновении кальция через мембраносвязанные рецепторы. eNOS и nNOS конститутивно выражены, iNOS – индуцируема [111, 112]. Индуцируемая форма iNOS (NOS2), как правило, связана с иммунной системой и вырабатывает NO в течение длительных периодов времени кальций-независимым образом, что обеспечивает гибкость иммунных реакций. eNOS синтезируется в эндотелиальных клетках сосудов; iNOS в основном связана с воспалением или патологическими состояниями, а nNOS обычно продуцируется в нейронах периферической и центральной нервной системы, а также в скелетных мышцах человека. iNOS требует индукции с помощью иммунологических факторов, таких как липополисахарид, интерферон и фактор некроза опухоли. Аналоги L-аргинина ингибируют ферменты NOS [113].

Альтернативным и важным источником образования NO является переработка нитратов и нитритов. Этот путь синтеза NO называется путем нитрат-нитрит-оксид азота и особенно актуален при гипоксических состояниях.

Единственным известным рецептором NO является фермент растворимая гуанилатциклаза. Таким образом, NO связывает гуанилатциклазу и увеличивает внутриклеточную концентрацию цГМФ. Тем не менее, NO также может трансформироваться в активные формы азота (АФА)

NO является основным предшественником АФА. Это многофункциональная молекула, которая участвует в сигнальных каскадах посредством активации растворимой гуанилатциклазы. Физиологические наномолярные (нМ) или пикомолярные (пМ) концентрации NO поддерживают нейротрансмиссию в центральной нервной системе. NO в этих концентрациях также участвует в расширении сосудов, определяющем приток крови к тканям, таким как мозг, печень, легкие, почки и сердце, в ответ на местные изменения окружающей среды. Однако он также может модифицировать белки посредством нитрозилирования, изменяя их активность. NO — бесцветный газ с низкой растворимостью в воде. Он парамагнитен и быстро разлагается в кислородсодержащих растворах, период полураспада которого составляет всего несколько секунд. Он гидрофобен, что важно для его физиологических функций, позволяя ему свободно проходить через мембраны клеток [114].

NO синтезируется изоформами NOS, которые включают нейрональную (nNOS), эндотелиальную (eNOS) и индуцибельную (iNOS) изоформы. Субстратом этих ферментов является аминокислота L-аргинин, и для реакции необходимы молекулярный O_2 , флавинадениндинуклеотид, флавиномононуклеотид, Ca^{2+} , кальмодулин, (6R)-5,6,7,8. -тетрагидро-L-биоптерин (BH_4) и НАД(Р)Н в качестве кофакторов. Превращение L-аргинина в l-цитруллин с образованием NO происходит в два этапа: первый этап — гидроксилирование l-аргинина до NG-гидрокси-l-аргинина, который является промежуточным метаболитом, а второй этап включает электронное окисление NG-гидрокси-l-аргинина, который связывается с двумя молями O_2 и 1,5 моль восстанавливающего эквивалента

НАД(Ф)Н, что приводит к образованию моля NO. Обе стадии катализируются комплексом гемового железа, присутствующим в ферменте [115]. Требуемый O_2^- может поступать из цепи переноса электронов в митохондриях, из пероксисом, НАД(Р)Н-оксидаз, ксантинооксидаз (ORX), цитохрома p450 и/или путей циклооксигеназы (COX).

1.9. Сигнальный путь оксида азота

Сигнальный путь оксида азота (NO), является одним из наиболее важных регуляторов функции сердца и сосудов. Влияние NO, синтезирующегося в клетках эндотелия, на работу сердечно-сосудистой системы реализуется путем связывания с рГЦ, которая служит единственным внутриклеточным рецептором NO и ферментом, катализирующим превращение гуанозинтрифосфата в цГМФ.

Физиологическое значение цГМФ заключается в том, что он является вторичным мессенджером, который взаимодействует с тремя типами внутриклеточных белков: цГМФ-зависимыми протеинкиназами (ПК), цГМФ-регулируемыми ионными каналами и фосфодиэстеразами (ФДЭ). Дальнейшие реакции с участием этих молекул опосредуют различные тканевые защитные физиологические эффекты, включая расслабление гладких мышц и подавление их пролиферации, противовоспалительное действие, контроль миграции лейкоцитов и функции тромбоцитов [116, 117].

Передача сигналов NO осуществляется посредством диффузии от места продукции к мишени, которая может находиться в той же клетке или в соседней. В клетке-мишени NO канонически активирует рГЦ путем нитрозилирования железа в его гемовой части, что, в свою очередь, увеличивает синтез цГМФ из клеточного ГТФ. Нитрозилирование – это прямое связывание радикала NO с переходным металлом, в данном случае Fe^{2+} [118]. Это активирует нижестоящие киназы, включая протеинкиназы, регулируемые цГМФ, и ионные каналы, чтобы регулировать различные физиологические процессы. Передача сигналов NO

также эффективно прекращается путем его прямого окисления в высшие оксиды азота. Нитрат, безусловно, является доминирующим продуктом конечного окисления, его уровни в плазме человека находятся в диапазоне 10–50 мкМ, тогда как уровень нитрита обычно ниже 1 мкМ [119].

NO в присутствии O_2^- может образовывать все АФА, но преобладающей образующейся молекулой является $ONOO^-$, которая является наиболее цитотоксичной. Образование $ONOO^-$ происходит примерно в три раза быстрее, чем дисмутация O_2^- супероксиддисмутазой (СОД). В результате разложения $ONOO^-$ образуется $\bullet NO_2$, который также является сильным окислителем. $\bullet NO_2$ может легко модифицировать различные биомолекулы, включая аминокислоту тирозин, образуя 3-нитротирозин и катехоламины [120].

1.10. Эффекты оксида азота (II) и пероксинитрита в норме и патологии

Молекула оксида азота является одной из реакционноспособных форм азота и играет важную роль в регуляции различных физиологических процессов, которые имеют решающее значение для функционирования организма. Поэтому оксид азота был выбран в качестве молекулы-трансммиттера 1992 года, а в 1998 году R. Furchgott, L. Ignarro и F. Murad была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине [121].

NO — молекула без заряда. Эта характеристика позволяет NO свободно проникать через мембрану, независимо от мембранных рецепторов и выполнять роль сигнальной молекулы или газотрансммиттера. Газотрансммиттерами принято называть подсемейство сигнальных молекул газообразных веществ, включающее в себя оксид азота (II), угарный газ, сероводород. Эти газы обладают сходными эффектами, оказываемыми на физиологию организма, однако выполняют свои функции уникальным образом, что отличает их от «классических» сигнальных молекул организма человека и животных, таких, как гормоны, цитокины или нейромедиаторы типа адреналина и ацетилхолина [122]. NO оказывает

физиологическое действие, контролируя сосудистый тонус, клеточную адгезию, проницаемость сосудов и адгезию тромбоцитов. С момента своего первого описания как эндотелиального релаксирующего фактора, NO стал рассматриваться как фундаментальный сигнальный механизм, регулирующий практически все критически важные клеточные функции, а также как мощный медиатор повреждения клеток в широком диапазоне состояний.

При нарушении передачи сигналов NO, процессы могут стать патофизиологическими, вызывая острые или хронические заболевания в ЦНС [123] сосудах [124], скелетных мышцах [125], иммунной и репродуктивной системе [126].

Большинство биологических эффектов, приписываемых оксиду азота, на самом деле обусловлены пероксинитритом. Реакция оксида азота с супероксидом ($O_2^{\bullet-}$) с образованием гораздо более мощного окислителя — пероксинитрита ($ONOO^-$) — является ключевым фактором, определяющим противоречивые роли оксида азота в физиологии и патологии.

Реакционная способность и разложение пероксинитрита зависят от химического окружения и соотношения супероксида и оксида азота. Пероксинитрит может инициировать токсические окислительные реакции *in vitro* и *in vivo*. Инициирование перекисного окисления липидов, прямое ингибирование ферментов дыхательной цепи митохондрий, инактивация глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, ингибирование активности мембранного Na^+/K^+ -АТФазного комплекса, инактивация мембранных натриевых каналов и другие окислительные модификации белков способствуют цитотоксическому действию пероксинитрита. Кроме того, пероксинитрит является мощным фактором, вызывающим разрыв цепей ДНК с последующей активацией ядерного фермента поли-АДФ-рибозилсинтетазы, что приводит к серьезному энергетическому истощению клеток [127].

И анион пероксинитрита ($ONOO^-$), и пероксинитритная кислота ($ONOOH$) могут напрямую вступать в реакции одно- и двухэлектронного окисления с биомолекулами. Наиболее распространенными изменениями белков,

вызываемыми пероксинитритом, являются нитрозилирование и димеризация остатков тирозина, окисление тиоловых групп цистеина и окисление серосодержащих групп метионина. Также было установлено, что разрушение кластеров металл-сера вызывает окислительную дезактивацию, модуляцию или ингибирование активности фермента. Однако большинство окислительных процессов, опосредованных пероксинитритом, приводят к нарушению клеточной окислительно-восстановительной сигнализации, повреждению клеток или гибели всего организма, поскольку, как было показано, пероксинитрит способствует развитию патофизиологических состояний при многих сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и воспалительных заболеваниях [128].

1.11. Моделирование нитрозативного стресса в экспериментальных условиях

Моделирование нитрозативного стресса заключается в создании экспериментальных систем для изучения повреждающего воздействия активных форм азота, таких как пероксинитрит. Основной характеристикой НС является нитрозилирование тирозина в белках с образованием 3-нитротирозина, который является ключевым биомаркером НС. Моделирование НС можно выделить те же направления, что и в моделировании EndMT (Рисунок 10):

Молекула оксида азота (II) является короткоживущей, поэтому для моделирования нитрозативного стресса в экспериментальных исследованиях для повышения уровня оксида азота используют его доноры.

Основными классами доноров NO являются: производные гуанидина, органические нитраты (RONO₂) и нитриты (RONO), комплексы нитрозилированных металлов, S-нитрозотиолы (RSNO) [129].



Рисунок 10 – Моделирование нитрозативного стресса в биологических исследованиях [130–132]

В большинстве исследований для *in vitro* моделирования НС используется S-нитрозоглутатион (GSNO). Например, в работах Zheng W. Q. (2020) исследовали влияние НС на ферменты митохондрий посредством S-нитрозирования. Для этого ученые обрабатывали очищенный белок S-нитрозоглутатионом в концентрации 500 мкМ, в течение 1 ч, а также митохондрии GSNO (1 мМ, 1 ч) [133]. Rosales M. A. B. (2014) с соавторами изучали способность S-нитрозоглутатиона подавлять активацию индуцибельной синтазы оксида азота за счет окислительно-восстановительной посттрансляционной модификации при экспериментальной диабетической ретинопатии. В своем исследовании они проводили инкубацию с GSNO (от 10 мкМ до 10 нМ) в течение 24 ч в клеточной линии ARPE-19 [134]. Абаленихина Ю. В. С соавторами изучали механизмы регуляции конститутивного андростанового рецептора (CAR) при воздействии S-нитрозоглутатиона *in vitro*. Исследование проводили на клеточной линии Caco-2, путем инкубации в питательной среде с

добавлением GSNO (концентрации 1, 10, 50, 100, 500 мкМ) в течение 3, 24 и 72 ч [134].

Однако стоит отметить, что использование S-нитрозоглутатиона обладает следующими ограничениями:

- 1) дополнительное образование глутатиона, обладающего антиоксидантными свойствами;
- 2) неспособность проникновения непосредственно в клетку и возможность активировать реакции нитрозилирования вне клетки;
- 3) длительная по времени передача сигналов NO в клетку.

Описанные в литературных источниках немногочисленные методики упоминают возможность использования пероксинитрита и его предшественников [135]. В большинстве проанализированных протоколов используются прекурсоры (S-нитрозоглутатион, нитропруссид натрия, 3-морфолиносиднонимин) – вещества, участвующие в реакции, приводящей к образованию целевого вещества (пероксинитрит). В нашем исследовании мы сосредоточились на моделировании нитрозативного стресса добавлением в питательную среду непосредственно целевого вещества – пероксинитрита.

Современные методы исследования не позволяют точно определить АФА, вызывающие нитрозативный стресс. Также существует недостаток практических методик для определения и количественной оценки НС. Определение 3-нитротирозина не отражает в полной мере уровень нитрозативного стресса. Нерешенной проблемой остается определение пороговых концентраций ONOO^- , которые обладают повреждающей способностью клеточных структур, и вызванные этим патофизиологические эффекты. Из выше сказанного становится понятна необходимость в поиске новых и усовершенствовании существующих методик моделирования НС.

1.12. Клеточная культура HUVEC: источник, использование в медико-биологических исследованиях

Эндотелиальные клетки вены пуповины человека HUVEC широко используются в качестве стандартной модельной системы для изучения общих принципов биологии и дисфункции эндотелиальных клеток. Пуповина является доступным биологическим материалом, что позволяет избежать этических проблем. Помимо вены пуповины существует множество источников выделения эндотелиоцитов. Выбор определенной клеточной культуры зависит от целей и задач исследования (Таблица 2).

Таблица 2 – Перечень основных культур первичных эндотелиальных клеток человека [136–138]

Источник	Локализация	Аббревиатура (англ.)	Расшифровка (англ.)	Примечания
Пуповинная вена	Венозный эндотелий	HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells	Наиболее часто используется в исследованиях
Аорта	Артериальный эндотелий	HAEC	Human Aortic Endothelial Cells	Применяется для изучения атеросклероза
Коронарная артерия	Артериальный эндотелий	HCAEC	Human Coronary Artery Endothelial Cells	Исследования в области кардиологии
Лёгочная артерия	Артериальный эндотелий	HPAEC	Human Pulmonary Artery Endothelial Cells	Для исследований заболеваний дыхательной системы
Внутренняя сонная артерия	Артериальный эндотелий	HCtAEC	Human Carotid Artery Endothelial Cells	Изучение цереброваскулярных процессов
Капилляры кожи, мозга, лёгких	Капиллярный эндотелий	HDMEC / HBMEC / HLMEC	Human Dermal / Brain / Lung Microvascular Endothelial Cells	Моделирование микроциркуляции

Первичные культуры HUVEC широко используются для фундаментальных и прикладных исследований в области сосудистой биологии, фармакологии и тканевой инженерии. HUVEC используются для изучения процессов ангиогенеза,

воспаления, тромбоза, атеросклероза и других сосудистых заболеваний. Также проводится тестирование лекарственных препаратов: оценка влияния новых соединений на эндотелий, его проницаемость, барьерные функции, продукцию адгезионных молекул и реакцию на воспалительные стимулы. HUVEC используют в изучении барьерных функций – формирования плотных контактов и регуляции сосудистой проницаемости. Тканевая инженерия и создание *in vitro* моделей сосудов, HUVEC применяют для формирования клеточных слоёв на биоматериалах, создания сосудистых протезов и других сложных структур. Исследования влияния механических факторов: клетки используют для изучения реакции эндотелия на напряжение сдвига (Рисунок 11).



Рисунок 11 – Применение HUVEC в медико-биологических исследованиях

Преимуществом использования клеточных культур является согласованность и воспроизводимость результатов. Клеточная культура является одним из основных инструментов, используемых в клеточной и молекулярной биологии. Она обеспечивает исследователей модельными системами для фундаментальных исследований. С ее помощью возможно изучение нормальной физиологии и биохимии клеток (например, транскрипция и трансляция, синтез белка, мембранный транспорт, клеточный цикл, дифференцировка, апоптоз, старение), исследование межклеточных взаимодействий (пара- и аутокринная регуляция, метаболические процессы, адгезия, взаимодействие с матриксом, способность к инвазии), а также геномика, протеомика.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Дизайн исследования

Для выполнения поставленных задач исследования, были сформированы следующие экспериментальные блоки:

Первый блок – изучение цитотоксического действия пероксинитрита и времени экспозиции на культуру клеток HUVEC;

Второй блок – изучение влияния пероксинитрита на биохимические показатели, характеризующие выраженность нитрозативного стресса в культуре клеток HUVEC;

Третий блок – оценка эффективности моделирования TGF β 1-индуцированного EndMT;

Четвертый блок – изучение влияния пероксинитрита на относительное количество маркеров EndMT;

Пятый блок – изучение влияния индуктора НС пероксинитрита на первичные культуры HUVEC, находящиеся в состоянии TGF β 1-индуцированного EndMT путем определения в клеточных лизатах уровня эндотелиальных (CD31, vWF) и мезенхимальных (FN, VIM) маркеров EndMT (Рисунок 12).

В качестве отрицательного контроля (К-: HUVEC + физ. р-р) выступали интактные первичные культуры HUVEC – клетки инкубировали с питательной средой ECGM с добавлением физиологического раствора без добавления тестируемого вещества. В качестве положительного контроля (К+: HUVEC + TGF- β 1 72 ч) – первичные культуры HUVEC после воздействия TGF- β 1 в течение 72 часов.

Опытные группы были сформированы следующим образом:

1. Моделирование нитрозативного стресса (HUVEC + ONOO⁻ t=2 ч) – воздействие пероксинитрита в конечных концентрациях 1, 10, 50, 100, 250 и 500 мкМ в течение 2 часов на первичные культуры HUVEC.

2. Воздействие НС на EndMT (HUVEC + TGF- β 1 (72 ч) + ONOO⁻ (2 ч) – последовательное сочетанное воздействие TGF- β 1 в течение 72 часов, а затем пероксинитрита в течение 2 часов на первичные культуры HUVEC. Каждый эксперимент был выполнен в 3 повторениях.

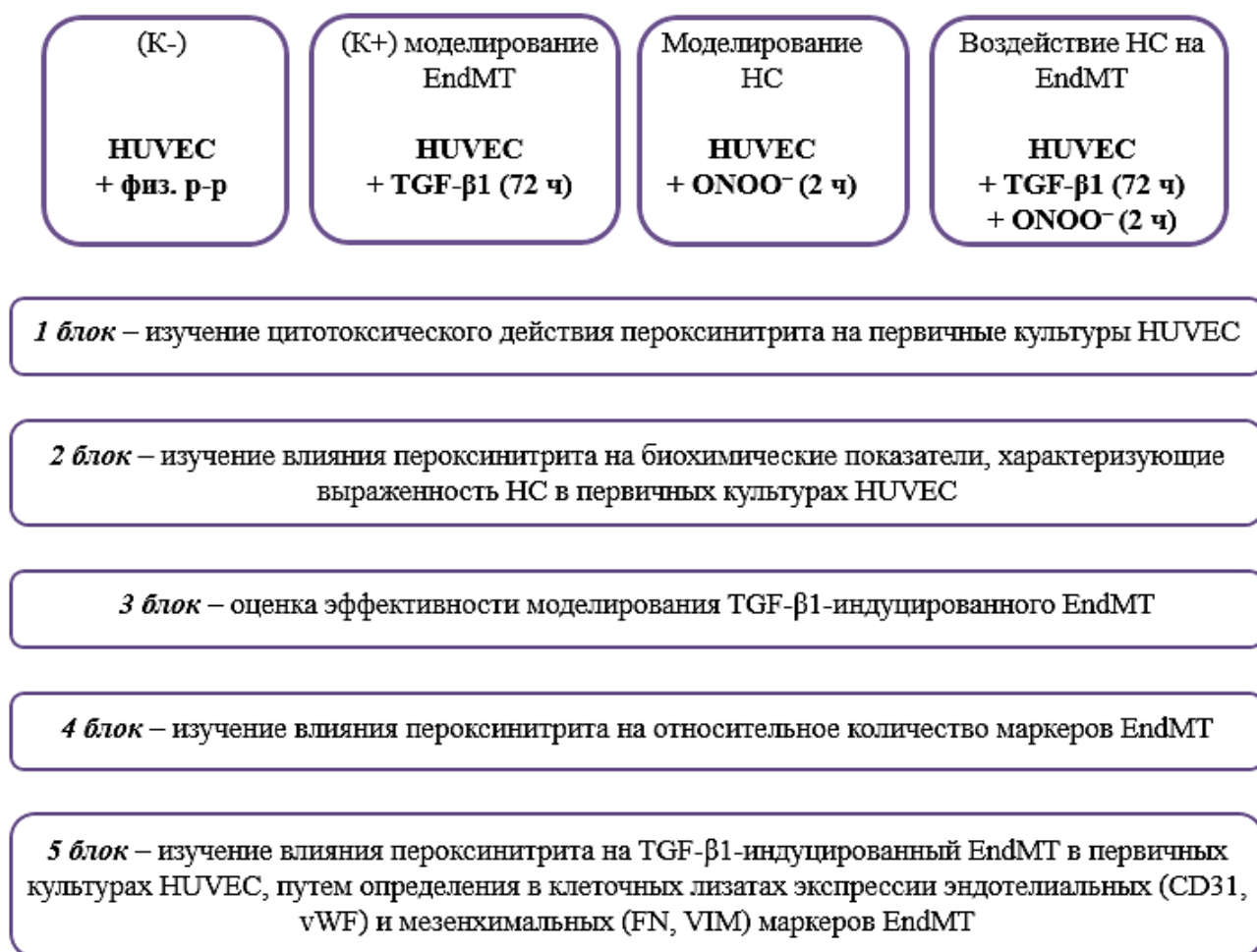


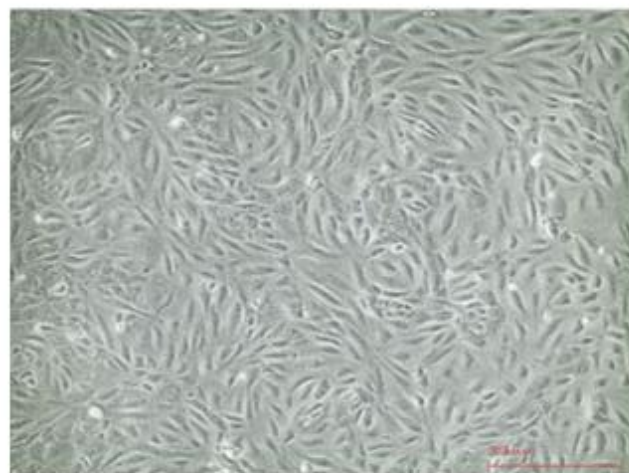
Рисунок 12 – Схема дизайна исследования влияния НС на EndMT *in vitro*

2.2. Объект экспериментальных исследований

Исследование выполнено с использованием первичных культур эндотелиальных клеток вены пуповины человека HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells), которая была выделена в лаборатории клеточных технологий МНОЛЦ РязГМУ с применением модифицированного протокола [138] Crampton S.P. et al., 2007 (Рисунок 13).



а) участок пуповины



б) первичная культура HUVEC

Рисунок 13 – Иллюстрация источника клеток и выделенной клеточной культуры

а) макроскопическое фото биологического материала;

б) фото микроскопии нативной первичной культуры HUVEC, ув. х 200

2.3. Получение первичных культур клеток

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (протокол № 2, от 16.09.2022).

Первичные культуры эндотелиальных клеток вены пуповины человека HUVEC выделяли из биоматериала, полученного от здоровых женщин-доноров, подписавших информированное согласие. Пуповины забирали после физиологических родов, помещали в стерильный транспортный контейнер, содержащий альфа-МЕМ (кат. № С180п, «ПанЭко», Россия), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (кат. № А063п, «ПанЭко», Россия) и доставляли в лабораторию клеточных технологий МНОЛЦ.

Далее биоматериал тщательно обрабатывали 70% этиловым спиртом, катетеризировали просвет вены и промывали теплым физиологическим раствором (кат. № Р011п, «ПанЭко», Россия). Затем заполняли вену 0,1% раствором коллагеназы (кат. № GC305013-1g, «Servicebio», Китай), края пуповины лигировали. Заполненную ферментом вену пуповины инкубировали в течение 20

минут в CO₂-инкубаторе при 37 °С. Далее лигированные концы пуповины освобождали от зажимов, промывали через катетер просвет сосуда раствором DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline, кат. № P061E, «ПанЭко», Россия) над пробиркой и осаждали методом центрифугирования 5 мин при 500g. Супернатант удаляли, клеточный осадок ресуспендировали в питательной среде ECGM (Endothelial Cell Growth Medium, кат. № 211-500, «Cell Applications», США) и переносили на предварительно желатинизированную культуральную посуду (кат. № 70025', «SPL Lifesciences», Китай). Схематично алгоритм действий изображен на Рисунке 14.



Рисунок 14 – Схема этапов выделения первичных культур HUVEC в лаборатории клеточных технологий МНОЛЦ

Условия культивирования. Клетки культивировали при 37°C и 5% содержании CO₂ в инкубаторе (D-180, «RWD», Китай) в питательной среде

ЕСGM, 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина соответственно.

2.4. Подтверждение принадлежности первичных культур клеток к HUVEC и визуализация маркеров EndMT методом иммуноцитохимии

Для подтверждения принадлежности полученных в ходе процедуры выделения первичных клеточных культур к HUVEC проводили определение специфических маркеров эндотелиоцитов иммуноцитохимическим методом.

Принцип метода. Иммуноцитохимия – метод окраски биологических объектов, для определения различных клеточных антигенов – белков, в основе которого лежит реакция «антиген – антитело». Данная реакция представляет собой специфическое связывание антигена (искомый белок) с соответствующим ему антителом (первичное антитело), приводящее к образованию иммунного комплекса. К этому комплексу присоединяется вторичное антитело, конъюгированное с флуорофором. Данный метод позволяет исследователям определить в образце наличие интересующего антигена и визуализировать локализацию искомого белка в клетке при обнаружении иммуноположительного сигнала (Рисунок 15).



Рисунок 15 – Схема образования иммунного комплекса

Ход определения. Первичные культуры выращивали на 96-луночных планшетах в течение 3-4 суток до достижения монослоя. Затем удаляли питательную среду, клетки промывали раствором DPBS, фиксировали охлажденным метанолом, пермеабилизировали мембрану 0,1 % раствором Тритон-Х-100 (кат. № Т8787, «Sigma-Aldrich», Германия), блокировали неспецифическое связывание белков 0,1 % раствором бычьего сывороточного альбумина BSA (Bovine Serum Albumin, кат. № 9048-46-8, «Диаэм», Россия). Далее клетки инкубировали с первичными антителами (разведение 1:100) при температуре +4 °С в течение ночи. Затем первичные антитела визуализировали вторичными антителами против белка кролика с флуоресцентными маркерами.

Локализацию ядра определяли окрашиванием DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, кат. № MBD0015 «Sigma-Aldrich», Германия) (разведение 1:50 000), инкубация с красителем составила 5 мин в темноте. Далее проводили микроскопирование на флуоресцентном микроскопе Olympus CKX-53 («Olympus», Япония) при 20-ти кратном увеличении.

Для определения в первичных культурах HUVEC маркеров эндотелиального (CD 31 и vWF) мезенхимального (FN и VIM) профиля клетки культивировали в 96-луночных планшетах, затем моделировали EndMT путем добавления рекомбинантного человеческого TGFβ-1 и выполняли иммуноцитохимическое исследование как описано ранее.

2.5. МТТ-тест

Влияние пероксинитрита на метаболическую (митохондриальную) активность при воздействии на клеточные культуры HUVEC оценивалась по результатам МТТ-теста.

Принцип метода. МТТ-тест — колориметрический тест для оценки активности митохондриальных НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктаз [139]. Данные ферменты способны восстанавливать тетразолиевый краситель 3-(4,5-

диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид в нерастворимый формазан, имеющий пурпурную окраску (Рисунок 16). Изменение активности НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктаз отражает количество жизнеспособных клеток.

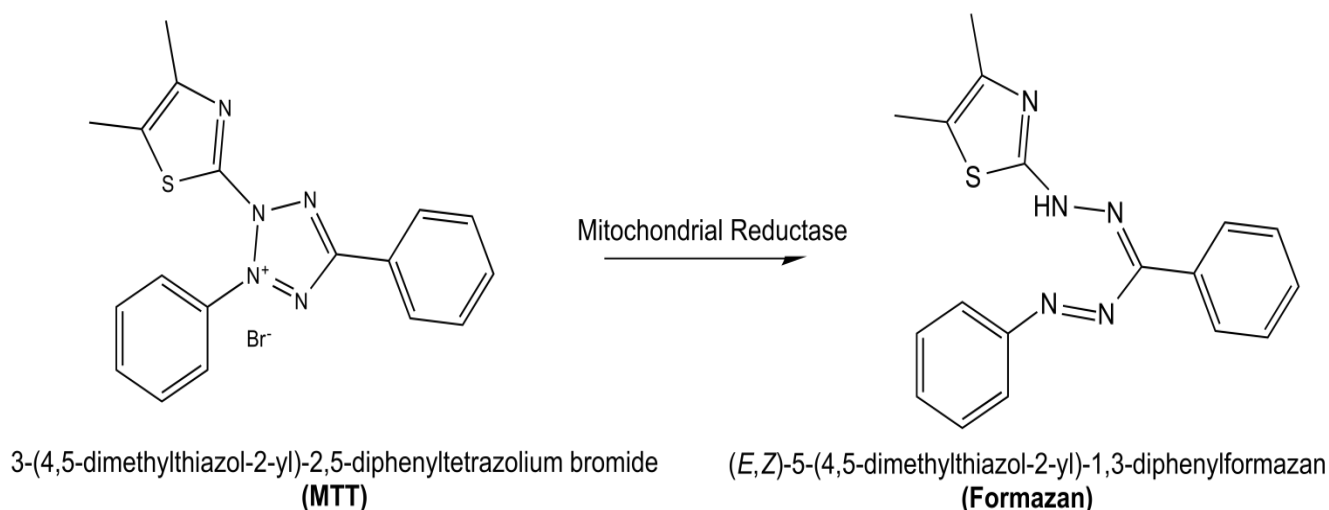


Рисунок 16 – Схема реакции превращения МТТ реактива в пурпурно-окрашенный формазан

Ход определения. Клетки засеивали в 96-луночный планшет из расчета 10^4 клеток на каждую лунку и культивировали в течение 3 суток. Затем добавляли питательную среду с исследуемым веществом. После окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл 0,5% раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия (МТТ, «ПанЭко», Россия) и инкубировали в течение 2 ч, после этого содержимое лунок удаляли и добавляли 100 мкл 1% раствора диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия) для растворения кристаллов формазана.

Метаболическую (митохондриальную) активность первичных культур HUVES при воздействии пероксинитрита оценивали фотокolorиметрически по оптической плотности растворов в лунках. Светопоглощение измеряли через 10 минут при 620 нм на спектрофотометре для планшетов StatFax 2100 («Awareness Technology», США). Результаты представляли в единицах оптической плотности на 100 мкл растворителя.

В эксперименте проводили изучение изменения митохондриальной активности клеток HUVEC при воздействии пероксинитрита в различные временные интервалы: 30, 60 и 120 минут и в диапазоне концентраций: 1, 10, 50, 100, 250 и 500 мкМ. Указанные концентрации выбраны с учетом литературных данных и проведенных ранее экспериментов [140].

2.6. Моделирование нитрозативного стресса в первичной культуре эндотелиоцитов HUVEC

Первичные культуры HUVEC 3 пассажа культивировали в 6-луночных планшетах (кат. № 30006', «SPL Lifesciences», Китай) в количестве 3×10^5 клеток на лунку в течение 3 суток до образования монослоя. Затем питательную среду удаляли, заменяли на новую с добавлением пероксинитрита в конечных концентрациях 1, 10, 50, 100, 250 и 500 мкМ, время экспозиции 2 часа.

Синтез пероксинитрита

Принцип метода. В основе получения лежит реакция взаимодействия нитрита натрия с пероксидом водорода. Для получения пероксинитрита в первую очередь создавали кислую среду. Для этого к смеси 3% пероксида водорода и концентрированной серной кислоты добавляли 1М нитрита натрия, затем сразу же изменяли pH на щелочную среду мгновенным добавлением 2М гидроксида натрия, для стабилизации пероксинитритного аниона. Избыток пероксида водорода удаляли путем добавления диоксида марганца, выдерживали до затухания реакции (прекращения выделения пузырьков), осадок отфильтровывали.

Конечную концентрацию пероксинитрита в растворе определяли спектрофотометрическим методом на спектрофотометре «СФ-2000» («Спектр», Россия) в монохроматическом пучке света в диапазоне длин волн 240–320 нм по оптической плотности раствора при 302 нм ($\epsilon_{302} = 1670 \text{ М}^{-1} \times \text{см}^{-1}$). Для этого в смеси 1 мл дистиллированной воды и 10 мкл гидроксида натрия растворяли 20 мл

раствора пероксинитрита и проводили измерения. Количественную оценку непрореагировавших соединений в растворе пероксинитрита определяли по примесям пероксида водорода и нитрита натрия [141, 142].

2.7. Определение показателей нитрозативного стресса

Для оценки эффективности моделирования НС путем воздействия пероксинитрита на первичные культуры HUVEC в лизатах клеток определяли уровень оксида азота, содержание битирозина и 3-нитротирозина.

Первичные культуры HUVEC засеивали в 6-луночные планшеты из расчета 10^5 клеток на каждую лунку и культивировали в течение 3 суток, затем добавляли питательную среду с исследуемым веществом. После окончания экспозиции клетки снимали с лунок раствором трипсин – ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», Германия). Клетки из расчета 1×10^6 промывали изотоническим солевым раствором («Медпро», Россия) и лизировали в 150 мкл ледяного буфера (50 мМ, рН 7,4 трисHCl, 150 мМ KCl, 0,5% тритон X-100, смесь ингибиторов протеиназ (аминоэтилбензенсульфонилфторида гидрохлорид (AEBSF) 2 мМ, апротинин 0,3 мкМ, бестатин 130 мкМ, ЭДТА 1мМ, эпоксисукциниллейцингуанидинобутиламид (E-64) 14 мкМ, лейпептин 1 мкМ, «Sigma-Aldrich», Германия), встряхивали на 45 шейкере и инкубировали на льду в течение 10 мин. Затем центрифугировали в течение 10 мин при 5000 g (СМ-50, «Eppendorf», Германия).

2.8. Определение уровня оксида азота при помощи флуоресцентных зондов DAF-FM

Определение уровня оксида азота (II) проводили с использованием флуоресцентных зондов DAF-FM (Invitrogen, США)

Принцип метода. Флуоресцентный зонд 4-амино-5-метиламино-2,7-дифлуоресциндиацетат DAF-FM (Invitrogen, США) [143] высокоселективен к NO. Зонд проникает через мембрану и деацетируется внутриклеточными эстеразами до флуоресцирующего бензотриазола (Рисунок 17). DAF-FM не флуоресцентен, пока не будет нитрозилирован продуктами окисления оксида азота, образуя флуоресцентные гетероциклы в цитоплазме.

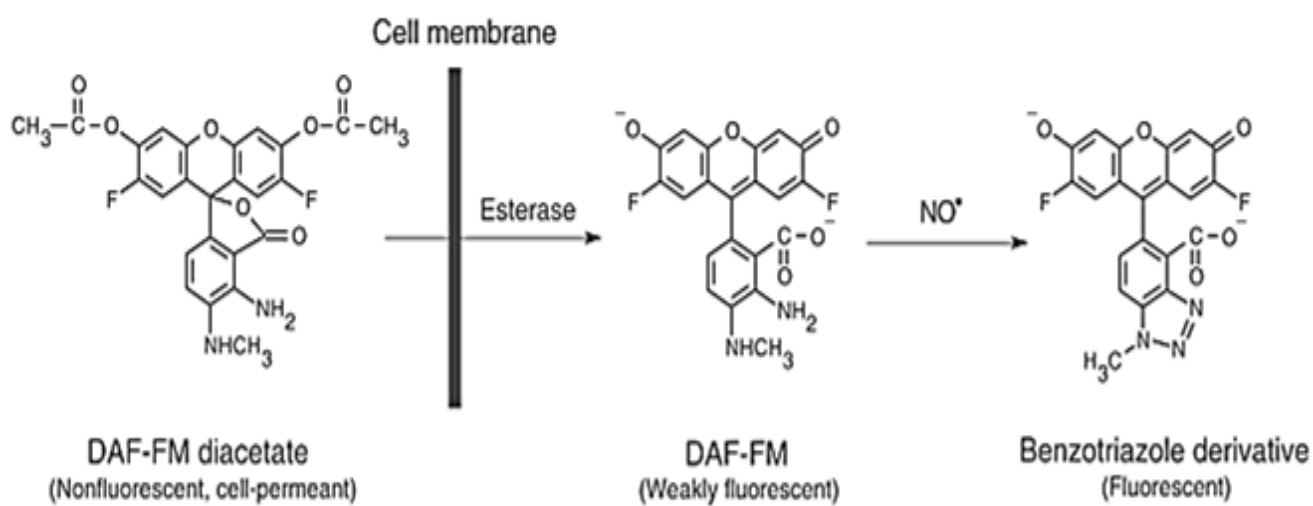


Рисунок 17 – DAF-FM диацетат проникает через мембрану клетки, взаимодействует с дериватами оксида азота (II) и образует флуоресцирующий бензотриазол

Ход определения. Раствор реактива DAF-FM в концентрации 10 мкМ добавляли в лунки 24-луночного планшета с монослоем HUVEC и инкубировали в CO₂-инкубаторе 30 минут при 37°C. После инкубации осуществляли промывку лунок раствором DPBS. Микроскопия клеток и ядер осуществлялось на инвертированном микроскопе Olympus CKX-53 («Olympus», Япония). После фотофиксации флуоресцентного свечения, готовили лизаты клеток. Для этого клетки снимали с культурального пластика струей раствора DPBS, а затем добавляли 200 мкл лизирующего буфера (50 мМ pH 7,4 Tris-HCl, 150 мМ KCl, 0,5% тритон X-100 (Sigma-Aldrich, Германия). Уровень оксида азота в клетках анализировали на спектрофлуориметре RF6000 (Shimadzu, Япония) по

интенсивности флуоресценции $\lambda_{ext}=495$ нм, $\lambda_{em}=515$ нм. Полученные значения выражали в ед.фл./ 10^6 клеток.

2.9. Определение битирозина методом спектрофлуориметрии

Оценку степени нитрозилирования белков под воздействием пероксинитрита в клетках линии НерG2 проводили путем количественного определения битирозиновых сшивок.

Принцип метода. Идентификацию битирозина проводили на основе его характерной способности к флуоресценции, интенсивность которой регистрировали при длине волны возбуждения $\lambda_{ext} = 325$ нм и длине волны испускания $\lambda_{em} = 415$ нм на спектрофлуориметре (Shimadzu RF-6000, Япония).

Ход определения. Клетки снимали с 6-луночного планшета, промывали раствором DPBS, добавляли 100 мкл лизирующего буфера (50 мМ рН 7,4 Tris-HCl, 150 мМ KCl, 0,5% тритон X-100), встряхивали на вортексе и инкубировали 10 минут. Контрольная проба содержала 180 мкл фосфатного буфера (рН 7,4) и 20 мкл дистиллированной воды. Опытные пробы содержали 180 мкл фосфатного буфера и 20 мкл пробы. Затем пробы инкубировали при 37°C в термостате «Гном» (ДНК-технологии, Россия) в течение 1 часа. По истечении инкубации оценивали интенсивность флуоресценции битирозина. Полученные результаты выражали в единицах флуоресценции, отнесенных на мг белка (ед.фл./мг белка).

2.10. Определение относительного количества 3-нитротирозина методом вестерн-блот

Принцип метода. Вестерн-блот служит для обнаружения искомым белков в результате реакции взаимодействия «антиген-антитело». Метод основан на электрофорезе белков в полиакриламидном геле для разделения денатурированных полипептидов по длине, затем их переносе на

нитроцеллюлозную мембрану с последующей детекцией при помощи антител, специфичных к искомому белку (Рисунок 18).

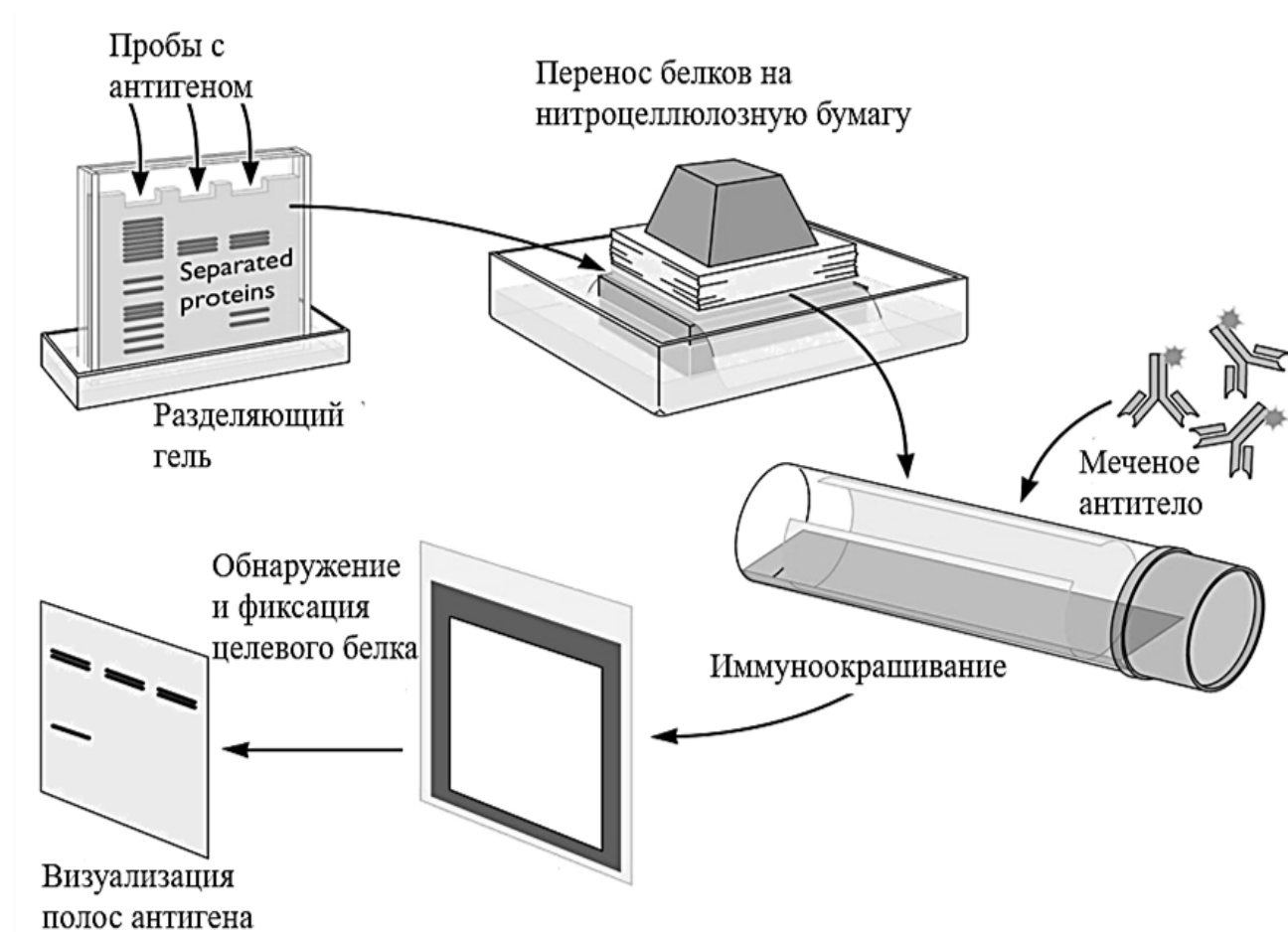


Рисунок 18 – Схематическое изображение основных этапов метода вестерн-блот (Цит. по: https://molekulerbiyologivegenetik.org/western-blotlama/?amp=&utm_medium=organic&utm_source=yandexsmartcamera с изменениями)

Подготовка проб. Первичные эндотелиоциты HUVEC культивировали в 6-луночных планшетах. После окончания инкубации с пероксинитритом в конечных концентрациях 1, 10, 50, 100, 250 и 500 мкМ, клетки снимали с культурального пластика раствором трипсина (0,25% трипсина с солями Хенкса, «ПанЭко», Россия) и промывали буферным раствором DPBS из расчета 1×10^6 . Затем готовили лизаты клеток с буфером RIPA (кат. № G2002-30ML, «Servicebio», Китай), центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 10 мин (центрифуга Avanti JXN-30; Beckman Coulter). Супернатант использовали для определения

относительного количества 3-нитротирозина (кат. № PAB863Ge01, «Affinity Biosciences», Китай,) методом вестерн-блот. Концентрацию белка в клеточном лизате измеряли методом Бредфорда [144]. Далее 20 мкг образца клеточного лизата добавляли в буфер Laemmli (BioRad, США), содержащий 2-меркаптоэтанол, в соотношении 1:2 и инкубировали 10 мин при температуре 70°C.

Ход определения. Полученные образцы фракционировали с помощью вертикального электрофореза (параметры настроек источника тока: напряжение 100 В, сила тока 25 А, 60 мин) в 10% полиакриламидных гелях SDS (sodium dodecyl sulfate). Для этого в стеклянную камеру для электрофореза готовили и заливали сначала разделяющий гель, затем поверх наслаивали концентрирующий гель. После заливки гелей, сверху в зазор стеклянных стенок камеры быстро и аккуратно вставляли тетрафторполиэтиленовую гребенку на 10 ячеек во избежание образования пузырьков воздуха. Камеру для электрофореза, заполненную гелями со вставленной гребенкой, оставляли в вертикальном положении при комнатной температуре для полимеризации гелей.

После электрофореза, гели с фракционированными белками переносили на нитроцеллюлозную мембрану полусухим способом с помощью автоматической системы Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, США) и проводили блокировку неспецифического связывания белков. Мембраны сначала инкубировали с первичными антителами при 4 ° С в течение ночи, а затем со вторичными антителами в течение 60 мин. Визуализация и анализ блотов производились с использованием системы ChemiDocXRS+ («Bio-Rad», США), интенсивность полученных бендов анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab. Количество исследуемых маркеров оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).

2.11. Моделирование EndMT в культурах первичных эндотелиоцитов HUVEC

Первичные культуры HUVEC засеивали в 6-луночные планшеты (кат. № 30006', «SPL Lifesciences», Китай) из расчета 3×10^5 клеток на каждую лунку и культивировали в течение 3 суток до образования монослоя. Затем производили смену питательной среды ECGM на бессывороточную среду Дульбекко (DMEM F-12) (кат. № C470E, «ПанЭко», Россия) в течение 3-х часов. Далее следовала смена среды на ECGM с рекомбинантным человеческим TGF- β 1 (Кат. № СУТ-561, «ProSpec», Израиль) в конечной концентрации 10 нг/мл при 37°C с инкубацией в течение 72 часов.

2.12. Определение эндотелиальных и мезенхимальных маркеров EndMT методом вестерн-блот

Клетки культивировали в 6-луночных планшетах, инкубировали с пероксинитритом, а далее проводили анализ, как описано в предыдущем разделе.

Для определения относительного количества эндотелиальных (CD31 и vWF) и мезенхимальных (FN и VIM) маркеров EndMT использовали реактивы, указанные в Таблице 3.

Таблица 3 – Перечень используемых реактивов для выполнения методик вестерн блот и иммуноцитохимии

Определяемый маркер	Принадлежность маркера	Первичные антитела «Affinity Biosciences», Китай, кат. №	Вторичные антитела «Affinity Biosciences», Китай, кат. №
CD 31	эндотелиальный	AF6191	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) кат. № S0013
vWF		AF3000	
VIM	мезенхимальный	AF5335	
FN		AF0292	
GAPDH	нормализация белка	AF5161	

2.13. Статистическая обработка данных

Первичные данные вносились и хранились в Microsoft Excel. Все данные были проанализированы с помощью программ StatSoft Statistica 13.0 и Prism 8.0 (программное обеспечение GraphPad). Для оценки результатов был выбран тест ANOVA. Дисперсионный анализ ANOVA — это статистический метод, используемый для сравнения средних значений двух или более групп путем анализа дисперсии. Данный ANOVA сравнивает величину вариации между средними значениями групп относительно величины вариации внутри каждой группы. Если межгрупповая вариация значительно выше, чем внутригрупповая, то можно сделать вывод, что значения групп различаются (сравнение проводится с помощью F-критерия). Основной принцип ANOVA основан на законе полной дисперсии, который гласит: полная дисперсия в наборе данных может быть разложена на компоненты, обусловленные различными источниками. Для ANOVA источниками являются межгрупповая и внутригрупповая вариация.

Оценку статистической значимости различий по сравнению с контролем проводили с применением теста Даннета. Тест Даннета — это анализ множественного сравнения, в котором каждая опытная группа сравнивается с одним контрольным значением. Для анализа множественных сравнений применяли тест Тьюки. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Количество проведенных экспериментов равно трем.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Подтверждение принадлежности первичных культур клеток к HUVEC

Определение специфических маркеров эндотелия (CD31 и vWF)

Для подтверждения того, что клетки, выделенные из вены пуповины, экспрессируют типичные эндотелиальные маркеры было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание на CD31 и vWF.

На изображении отмечается иммунопозитивное окрашивание на CD31 – белок межклеточной адгезии, который локализуется на мембране клеток в виде зеленого контура, что отражает их свойство формировать механический барьер, ядра (синий) окрашены DAPI (Рисунок 19). vWF, напротив, имеет внутриклеточную локализацию, vWF-положительное окрашивание характеризуется как диффузные скопления зеленого цвета в цитоплазме клеток, что соответствует накоплению гликопротеина в специальных органеллах эндотелиоцитов – тельцах Вейбеля-Палладе (Рисунок 20).

Характерными маркерами эндотелиоцитов являются: vWF, PECAM/CD31, ICAM-1/CD54, VCAM-1/CD106, VE-cadherin, VEGF-R2. vWF – белок, необходимый для первичного гемостаза. Он участвует в процессе адгезии тромбоцитов к участкам повреждения сосудов путем связывания гликопротеинов тромбоцитарной мембраны с коллагеном дефекта сосудистой стенки. Одной из специфических групп трансмембранных белков, характерных для эндотелиальных клеток, являются молекулы клеточной адгезии: PECAM/CD31, ICAM-1/CD54, VCAM-1/CD106, VE-cadherin, которые также позволяют достоверно определить гистогенетическую принадлежность клеток. PECAM-1/CD31 – молекула адгезии, обеспечивающая трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов, ангиогенез и активацию интегринов. CD31 относится к суперсемейству иммуноглобулинов и обнаруживается преимущественно в области межэндотелиальных контактов. CD31 экспрессируется эндотелиоцитами, клетками крови, а также тромбоцитами и лейкоцитами. В эндотелиоцитах эта молекула контролирует адгезионные

свойства. В физиологических условиях PECAM-1 поддерживает функцию эндотелиального барьера, регулирует адгезию эндотелия, миграцию, опосредованную межклеточными взаимодействиями, а также участвует в регуляции трансмиграции лейкоцитов через соединения эндотелиальных клеток при воспалении. Стимуляция эндотелия или его повреждение приводят к дополнительной продукции молекул адгезии – селектинов ICAM-1 и VCAM-1 [145].

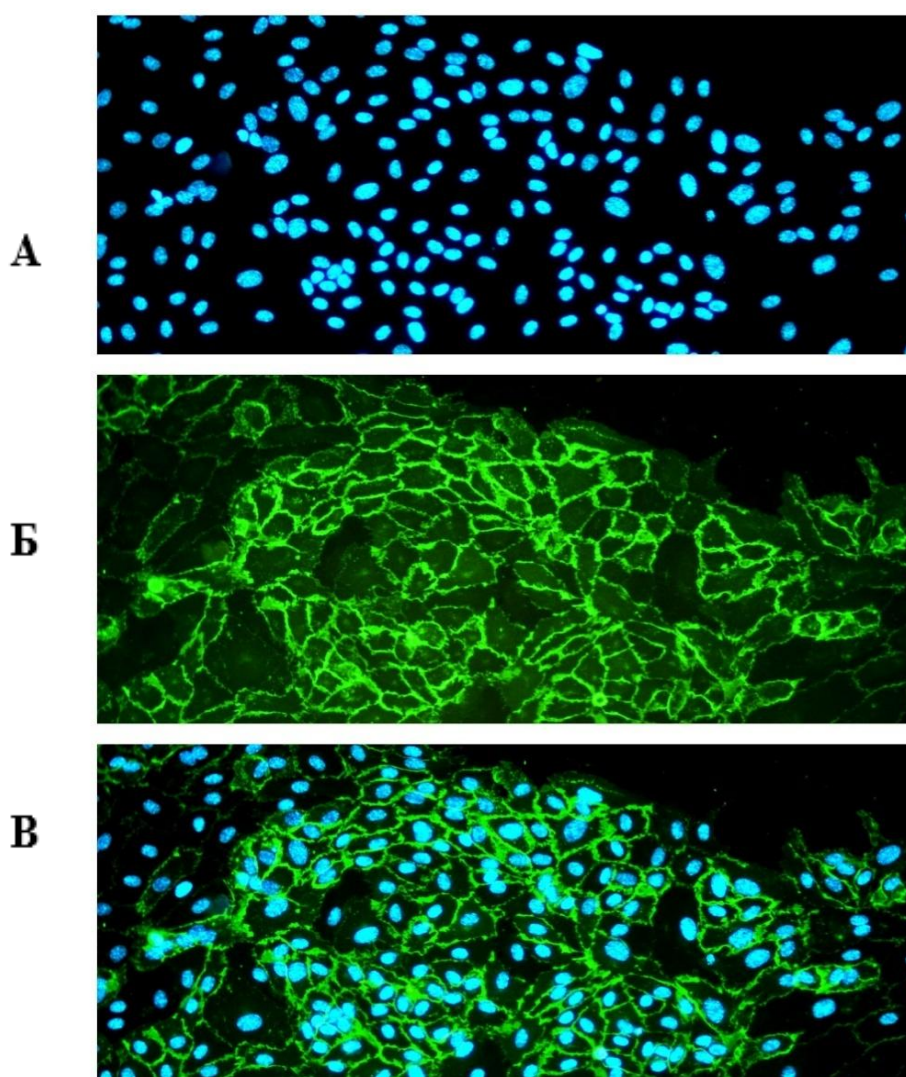


Рисунок 19 – Результаты иммуноцитохимического исследования полученных первичных культур с использованием антител к CD31

А) окрашивание ядер клеток флуоресцентным красителем DAPI, ув. $\times 200$;

Б) окрашивание мембраны клеток антителами к CD31, ув. $\times 200$;

В) двойная экспозиция изображений демонстрирует расположение окрашивания клеточных структур относительно друг друга, ув. $\times 200$

Данные исследования показали иммуноположительную реакцию на исследуемые маркеры и локализацию, соответствующую их функциональным клеточным характеристикам. Специфические маркеры были обнаружены в исследуемых клетках, что продемонстрировано на фото.

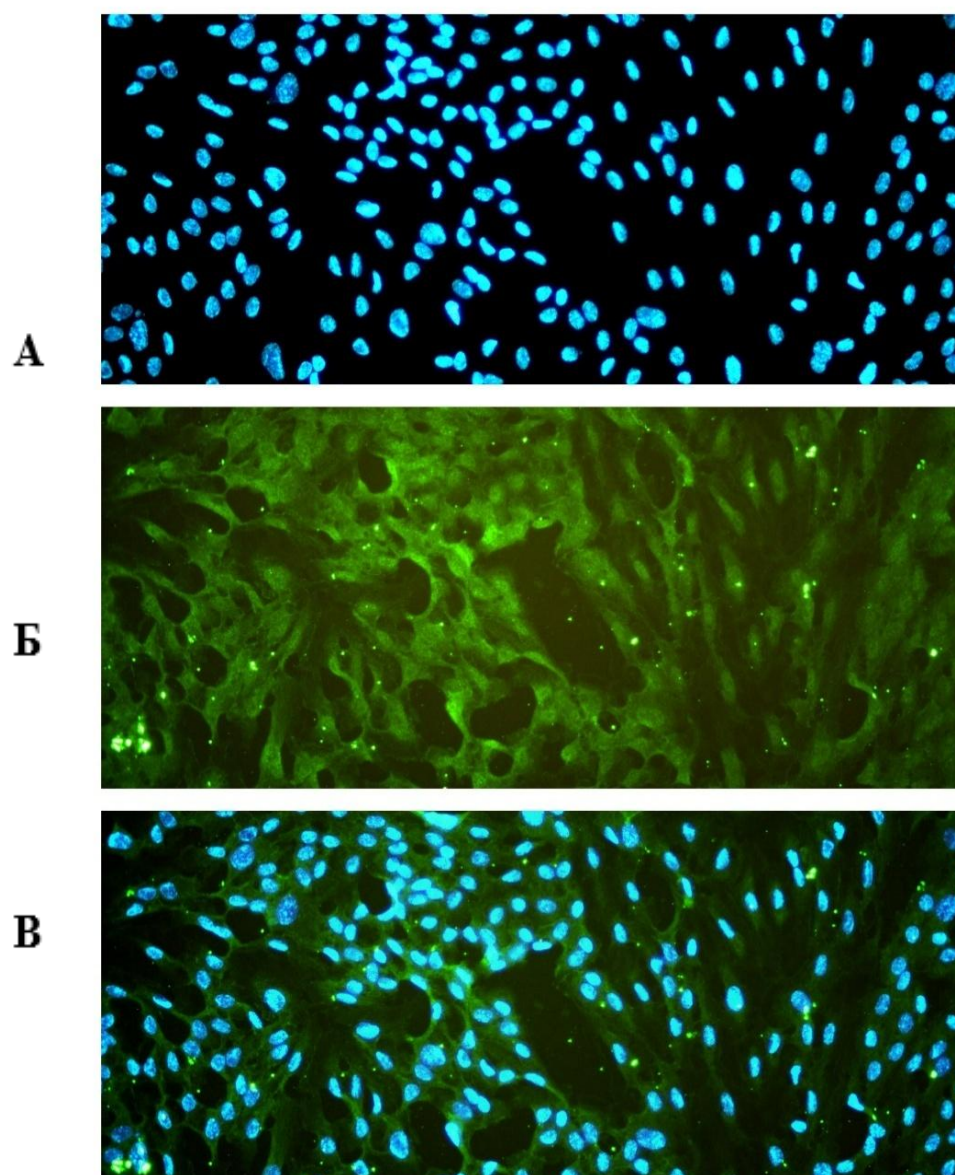


Рисунок 20 – Результаты иммуноцитохимического исследования полученных первичных культур с использованием антител к vWF

- А) окрашивание ядер клеток флуоресцентным красителем DAPI, ув. $\times 200$;
- Б) окрашивание цитоплазмы клеток антителами к vWF, ув. $\times 200$;
- В) двойная экспозиция изображений демонстрирует расположение окрашивания клеточных структур относительно друг друга, ув. $\times 200$

Результаты иммуноцитохимического исследования показали наличие специфических эндотелиальных маркеров CD31 (Рисунок 19) и vWF (Рисунок 20) в выделенных первичных культурах, что подтвердило принадлежность культур к эндотелиоцитам.

3.2. МТТ-тест

Для оценки жизнеспособности клеток проводили МТТ-тест, с помощью которого были определены концентрации пероксинитрита, оказавшие достоверное изменение митохондриальной активности первичных культур HUVEC.

Таблица 4 – Результаты МТТ-теста

Исследуемые группы	Время экспозиции, Ме (НК, ВК) ед. опт. пл. раствора			Значение p
	30 мин	60 мин	120 мин	
Контроль	0,266 (0,199;0,332)	0,221 (0,137;0,338)	0,232 (0,132;0,326)	0,205
1 мкМ	0,279 (0,251;0,307)	0,182 (0,121;0,267)	0,203 (0,123;283)	0,097
10 мкМ	0,226 (0,199;0,302)	0,183 (0,108;0,255)	0,186 (0,113; 0,271)	0,338
50 мкМ	0,248 (0,204;0,298)	0,18 (0,103;0,253)	0,18 (0,103;0,253)	0,174
100 мкМ	0,27 (0,192;0,331)	0,169 (0,112;0,245)	0,0,195 (0,113;0,272)	0,076
250 мкМ	0,273 (0,193;0,35)	0,218 (0,141;0,313)	0,225 (0,12;0,328)	0,001** p _{30м-60м} = 0,014* p _{30м-120м} = 0,001** p _{60м-120м} = 1
500 мкМ	0,321 (0,187;0,458)	0,304 (0,176;0,418)	0,234 (0,122;0,431)	0,174

Обработка данных показала наличие статистически значимых различий в метаболической активности культур клеток при использовании пероксинитрита в концентрации 250мкМ: при времени экспозиции 30 и 60 минут значения оптической плотности составили 0,273 (0,193; 0,35) и 0,218 (0,141; 0,313),

соответственно ($p = 0,014$) и 30 и 120 минут 0,273 (0,193; 0,35) и 0,225 (0,12; 0,328), соответственно ($p = 0,001$) [146] (Таблица 4).

В результате синтеза пероксинитрита был получен раствор с концентрацией 48 мМ, спектр для которого представлен на Рисунке 21.

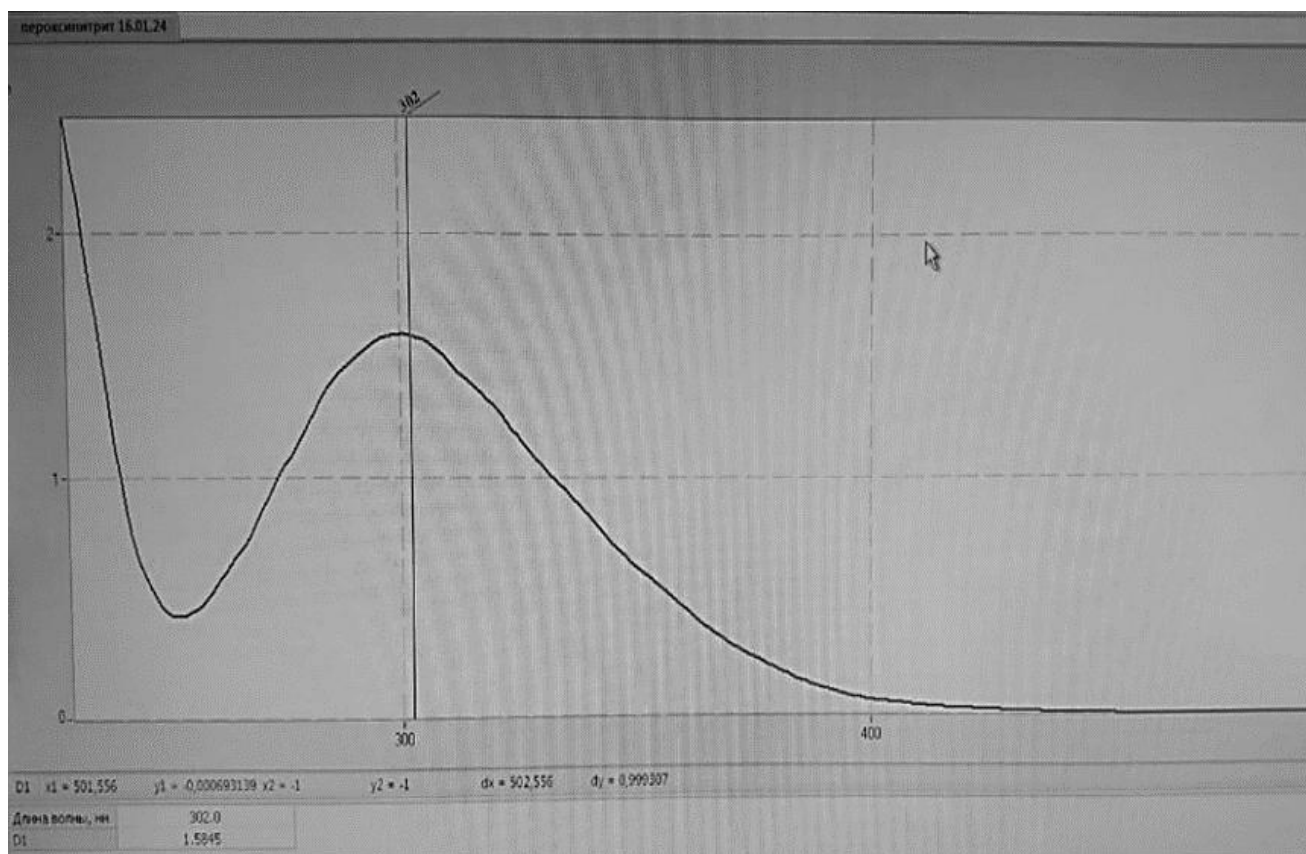


Рисунок 21 – Пик пероксинитрита (концентрация 48 мМ), полученный на спектрофотометре

В литературе встречаются разные данные о времени инкубации с пероксинитритом и использовании его различных концентраций: Nouredine Loukili et. al. (2010) изучали воздействие пероксинитрита на некроз при инфаркте миокарда использовали ONOO^- в концентрациях 100–250 μM в течение 40 min [147], Michael Kirsch et. al. (1998) при изучении буферных растворов для экспериментов с пероксинитритом НС использовали индуктор ONOO^- – SIN-1 в течение 2 часов [148].

При этом, согласно литературным данным, инкубация культур клеток с ПН в течение 60-120 минут не приводит к необратимым изменениям в клетках [149].

Таким образом, для последующего эксперимента нами было выбрано время экспозиции 2 часа с целью получения демонстративных результатов: с одной стороны, имея цитотоксическое воздействие пероксинитрита на культуру клеток, с другой – с сохраненной метаболической активностью клеток, т.е. отсутствием критического снижения митохондриальной активности. Помимо непосредственного (цитотоксического) эффекта пероксинитрита на первичные культуры ЭЦ, влияние пероксинитрита на метаболическую активность клеток оказывают окислители, образующиеся при распаде кислорода, такие как супероксид или гидроксильный радикал [150].

3.3. Влияние пероксинитрита на изменение показателей нитрозативного стресса (подтверждение эффективности моделирования НС)

3.3.1. Определение уровня NO

Для подтверждения моделирования НС в первичных эндотелиоцитах HUVEC под воздействием пероксинитрита, проводили определение уровня оксида азота (NO) при помощи флуоресцентных зондов DAF-FM.

Воздействие пероксинитрита в течение 2 часов на первичные культуры HUVEC приводило к статистически значимому увеличению уровня оксида азота в клетках по сравнению с контролем. NO в опытных группах 1, 10, 50, 100, 250 и 500 мкМ был повышен на 28% ($p<0,01$); 63% ($p<0,0001$); 71% ($p<0,0001$); 87% ($p<0,0001$); 122% ($p<0,0001$) и 156% ($p<0,0001$) соответственно, по сравнению с контролем. Важно отметить, что изменения носили дозозависимый характер (Рисунок 22).

В эксперименте с использованием DAF-FM пероксинитрит вызвал повышение внутриклеточного уровня NO (Рисунки 22, 23). Таким образом, была подтверждена эффективность моделирования НС при помощи различных

концентраций пероксинитрита в первичных культурах HUVEC *in vitro* с использованием флуоресцентных зондов DAF-FM.

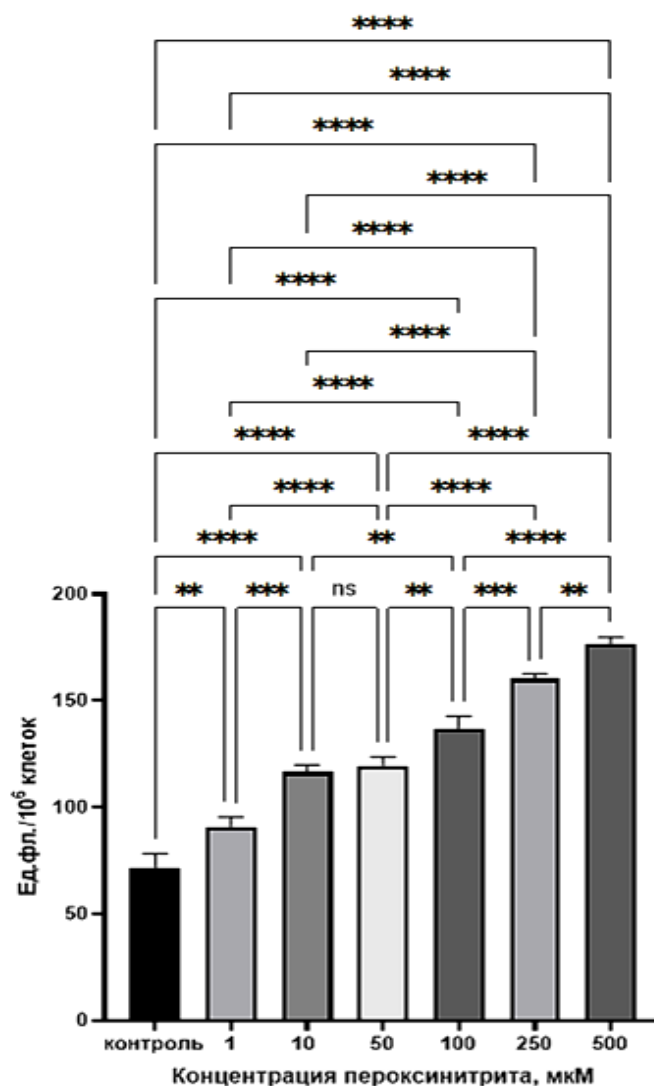


Рисунок 22 – Результаты измерений уровня NO флуоресцентными зондами DAF-FM при моделировании НС различными концентрациями пероксинитрита в первичных культурах HUVEC

Примечание – результаты представлены в виде среднего значения и среднего отклонения статистически значимые отличия от контроля, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

На рисунке 23 показано обнаружение флуоресцентного свечения зондов DAF-FM (зеленый цвет) зарегистрированного флуоресцентным микроскопом Olympus CKX-53 при 20-ти кратном увеличении, ядра (синий цвет) окрашены DAPI.

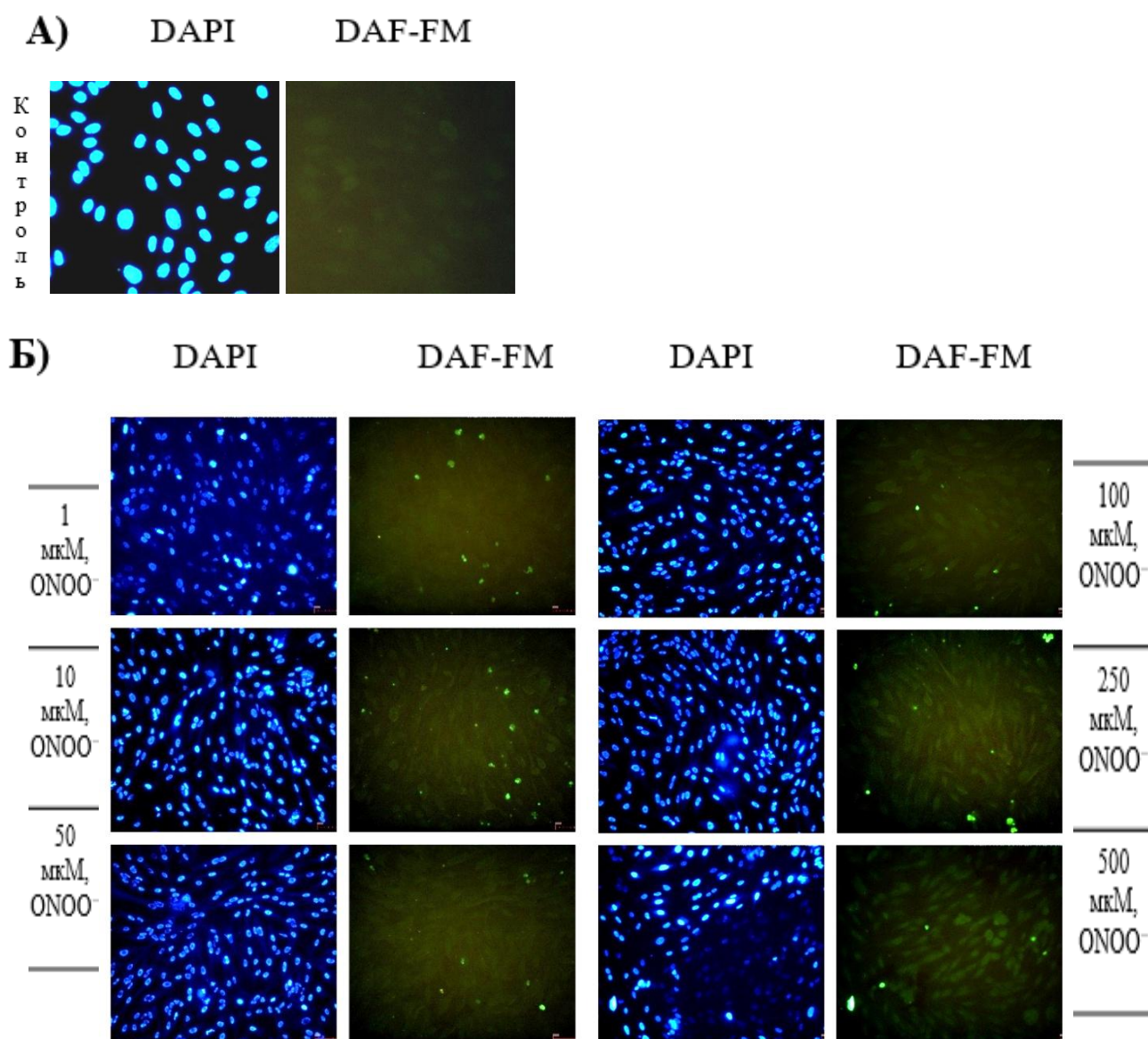


Рисунок 23 – Результаты измерений уровня NO флуоресцентными зондами DAF-FM при моделировании НС различными концентрациями пероксинитрита в первичных культурах HUVEC

А) контроль (К) – первичные культуры HUVEC без воздействия пероксинитрита

Б) опытные группы – первичные культуры HUVEC при воздействии различных концентраций пероксинитрита.

Примечание – статистически значимые отличия от контроля, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Оксид азота, помимо регуляторной функции, является индуктором нитрозативного стресса, который приводит к повреждению клеток за счет окисления белков, жиров и углеводов. Пероксинитрит вызывает повышение

уровня оксида азота и других реактивных форм азота в основном за счет механизмов, связанных с окислительным стрессом, воспалением и нарушением клеточной сигнализации. Пероксинитрит образуется из NO, но его избыток создает патологический порочный круг, приводящий к еще большему образованию NO и его метаболитов.

Причины повышения NO под воздействием пероксинитрита:

- Активация индуцибельной NO-синтазы: пероксинитрит может образовываться в условиях воспаления и вызывать активацию синтеза iNOS. Повышенный уровень iNOS приводит к повышению NO, что ведет к HC [151].
- Дисфункция эндотелиальной NO-синтазы (eNOS): пероксинитрит может окислять тетрагидробиоптерин (BH4) — кофактор eNOS. Без BH4 фермент eNOS переходит в «разобщенное» состояние и начинает производить не NO, а супероксид-анион, который, в свою очередь, реагирует с остаточным NO с образованием еще большего количества пероксинитрита [152].
- Освобождение NO из депо: пероксинитрит и образующиеся из него свободные радикалы могут способствовать высвобождению NO из железо-серных комплексов [153].
- Косвенное увеличение через провоспалительные факторы: повышенный уровень пероксинитрита вызывает повреждения, которые провоцируют клетки иммунной системы (макрофаги) вырабатывать еще больше NO. Таким образом, пероксинитрит не синтезирует NO напрямую, а нарушает систему контроля его синтеза, заставляя клетки перепроизводить его через iNOS и блокируя нормальную работу ферментов (eNOS), что ведет к нитрозативному стрессу [154].

3.3.2. Определение 3-нитротирозина

Характерным индикатором HC является нитрозилирование тирозина. Поэтому для подтверждения моделирования HC в первичных эндотелиоцитах HUVEC определяли содержание 3-нитротирозина.

Воздействие пероксинитрита в концентрациях 10;50;100;250 и 500 мкМ в течение 2 часов вызывало повышение уровня 3-нитротирозина в лизатах клеток на 27,3% ($p=0,0044$), 34% ($p=0,007$), 52,3% ($p<0,0001$), 64% ($p<0,0001$), 73,3% ($p<0,0001$) соответственно. Изменения носили дозозависимый характер (Рисунок 24).

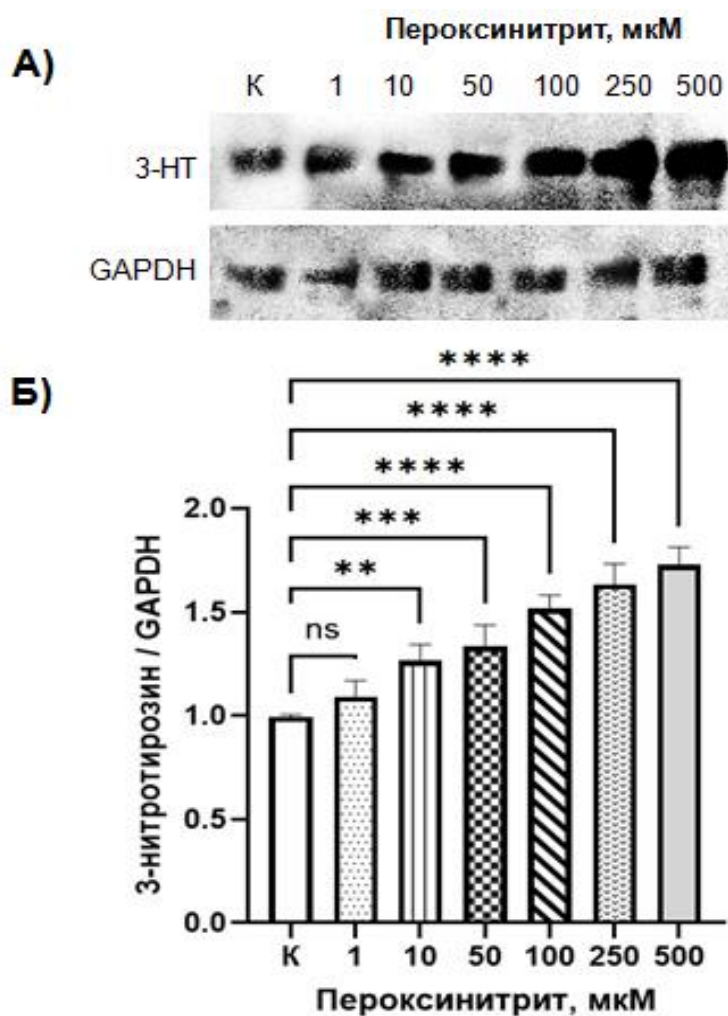


Рисунок 24 – Результаты определения относительного количества маркера нитрозативного стресса 3-НТ в первичных культурах HUVEC при воздействии пероксинитрита в течение 2 ч

А) изменение относительного количества 3-НТ относительно контроля

Б) результаты денситометрического анализа, выполненного при помощи программного обеспечения ImageLab

Примечание – статистически значимые отличия от контроля, ** $p=0,0044$; *** $p=0,007$; **** $p<0,0001$

Воздействие пероксинитрита повышало внутриклеточный уровень оксида азота, который, в свою очередь, вызывал процесс нитрозилирования белков, что подтверждалось повышением относительного количества 3-нитротирозина.

В ходе исследования было установлено, что воздействие пероксинитрита в концентрациях 10–500 мкМ и времени экспозиции 2 часа повышало уровень 3-нитротирозина.

Пероксинитрит запускает каскад окислительных модификаций, которые затрагивают не только тирозин, но и другие аминокислоты [155]. Пероксинитриту присуща двойственность: он может действовать и как окислитель, и как нитрозирующий агент. Баланс между этими состояниями зависит от микроокружения клетки (рН, концентрация и наличие антиоксидантов) [156].

3.3.3. Определение битирозина

Воздействие пероксинитрита на клеточную культуру HUVEC в течение 2 ч достоверно повышало относительное количество битирозина в концентрациях 1, 10 и 50 мкМ относительно контроля и снижало относительное количество битирозина в концентрациях 100, 250 и 500 мкМ (Рисунок 25).

Уровень битирозина повышается во время нитрозативного стресса, поскольку пероксинитрит, запускает окислительные реакции, которые превращают фенольное кольцо тирозина в тирозиновый радикал. Два таких радикальных остатка тирозина затем соединяются и образуют стабильную ковалентную связь между ними, создавая димер тирозина – дитирозин, который выступает биомаркером повреждения белковых структур [157]. Количественное содержание нитрозилированных производных зависит от экспозиции. Наблюдалось нарастание преимущественно 3-нитротирозина. Снижение концентрации битирозина можно объяснить тем, что срок экспозиции 2 часа был недостаточен для реакции конденсации тирозиновых радикалов в битирозин.

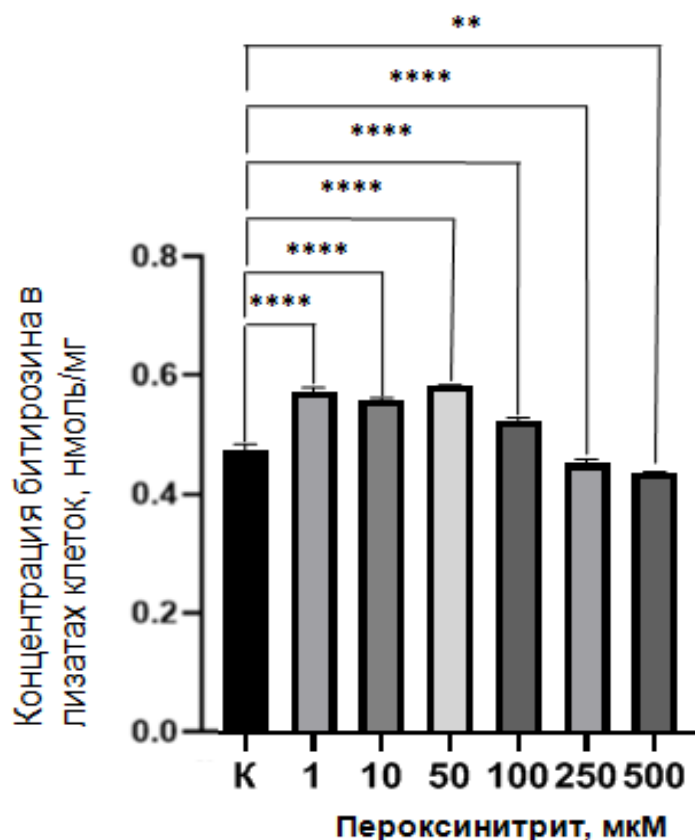


Рисунок 25 – Количественное определение концентрации битирозина в лизатах первичной культуры HUVEC под действием пероксинитрита в концентрациях 1-500 мкМ в течение 2 часов

Примечание – статистически значимые отличия от контроля, ** $p=0,0039$; **** $p<0,0001$

3.4. Оценка эффективности моделирования TGF- β 1-индуцированного EndMT *in vitro* в первичных культурах HUVEC

3.4.1. Определение маркеров эндотелиального профиля (CD31 и vWF)

Инкубация первичной культуры HUVEC с TGF- β 1 в концентрации 10 нг/мл в течение 72 часов вызывала статистически значимое снижение относительного количества CD31 на 45,4% ($p=0,0005$) и vWF на 34,3% ($p=0,005$) относительно контроля (Рисунки 26, 27).

TGF- β 1 активно подавляет транскрипцию генов, ответственных за поддержание эндотелиального фенотипа. Снижение уровня специфических эндотелиальных маркеров в клеточных лизатах указывает на потерю

эндотелиоцитами своих характерных свойств, что является характерным признаком EndMT.

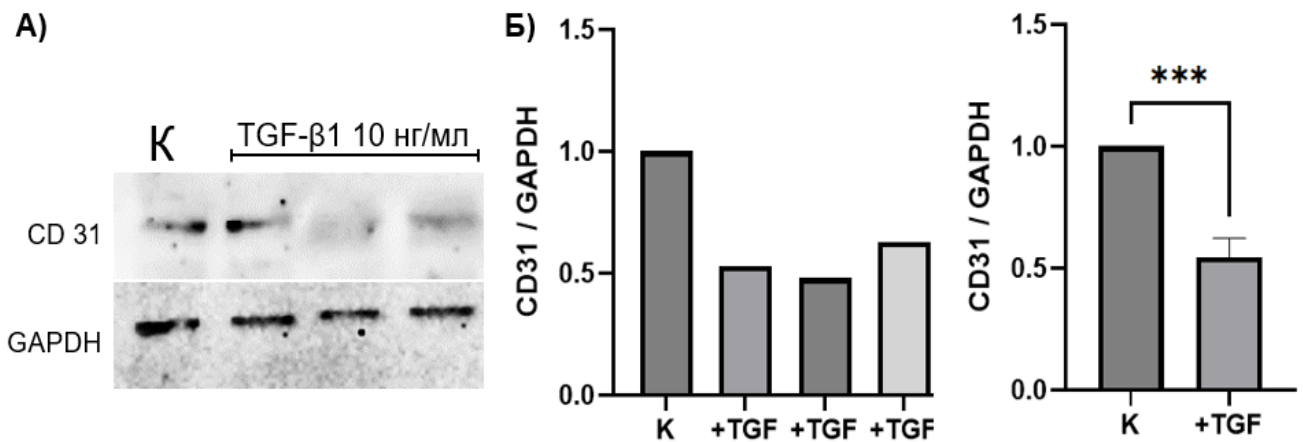


Рисунок 26 – Результаты определения относительного количества эндотелиального маркера CD 31 в первичных культурах HUVEC при воздействии TGF-β1 (10 нг/мл) в течение 72 ч

А) изменение относительного количества CD 31 относительно контроля
Б) результаты денситометрического анализа, выполненного при помощи программного обеспечения ImageLab

Примечание – статистически значимое отличие от контроля, *** $p=0,0005$

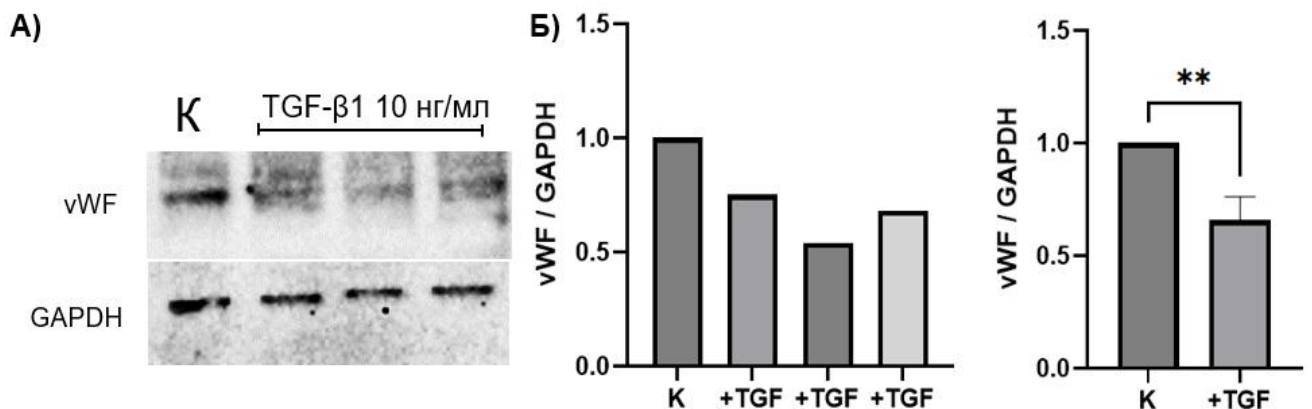


Рисунок 27 – Результаты определения относительного количества эндотелиального маркера vWF в первичных культурах HUVEC при воздействии TGF-β1 (10 нг/мл) в течение 72 ч

А) изменение относительного количества vWF относительно контроля
Б) результаты денситометрического анализа, выполненного при помощи программного обеспечения ImageLab

Примечание – статистически значимое отличие от контроля, ** $p=0,005$

3.4.2. Определение маркеров мезенхимального профиля (FN и VIM)

После инкубации с TGF- β 1 (10 нг/мл) в течение 72 часов было установлено повышение относительного количества FN на 43,3% ($p=0,005$) и VIM на 50,7% ($p=0,0001$) относительно контрольных значений (Рисунки 28, 29).

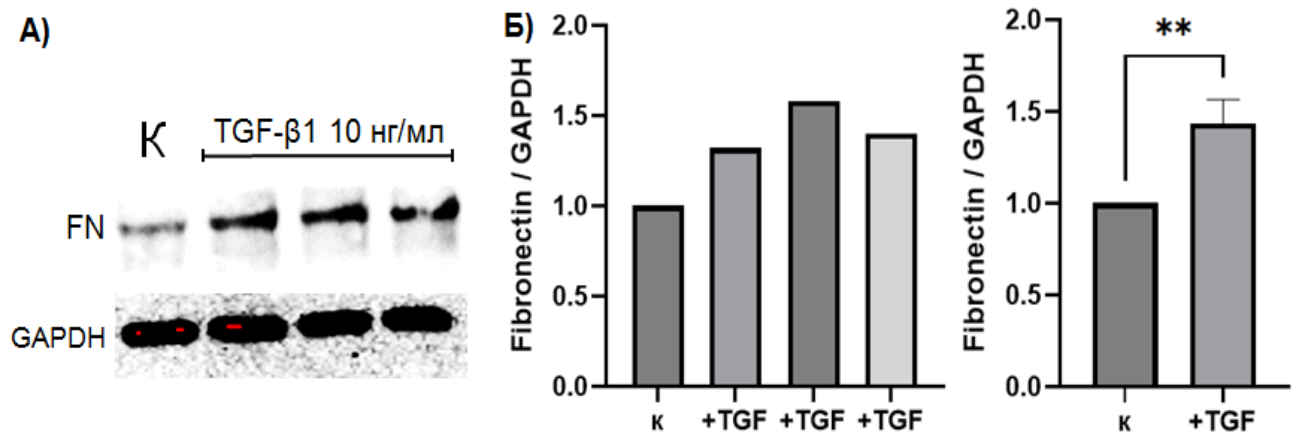


Рисунок 28 – Результаты определения относительного количества мезенхимального маркера FN в первичных культурах HUVEC при воздействии TGF- β 1 (10 нг/мл) в течение 72 ч

А) изменение относительного количества FN относительно контроля
 Б) результаты денситометрического анализа, выполненного при помощи программного обеспечения ImageLab

Примечание – статистически значимое отличие от контроля, ** $p=0,005$

TGF- β 1 является фактором, стимулирующим ремоделирование внеклеточного матрикса. TGF- β 1 усиливает фибрилlogenез – стимулирует клеточные механизмы сборки растворимого FN в нерастворимые, сшитые внеклеточные фибриллы. Сети фибронектина также способствуют концентрации и активации латентного TGF- β 1, создавая синергетическую петлю обратной связи между двумя белками. Индуцированное TGF- β 1 накопление филаментов виментина изменяет цитоскелет клетки, обеспечивая механическую жесткость и пластичность, необходимые для миграции и инвазии клеток в ткани.

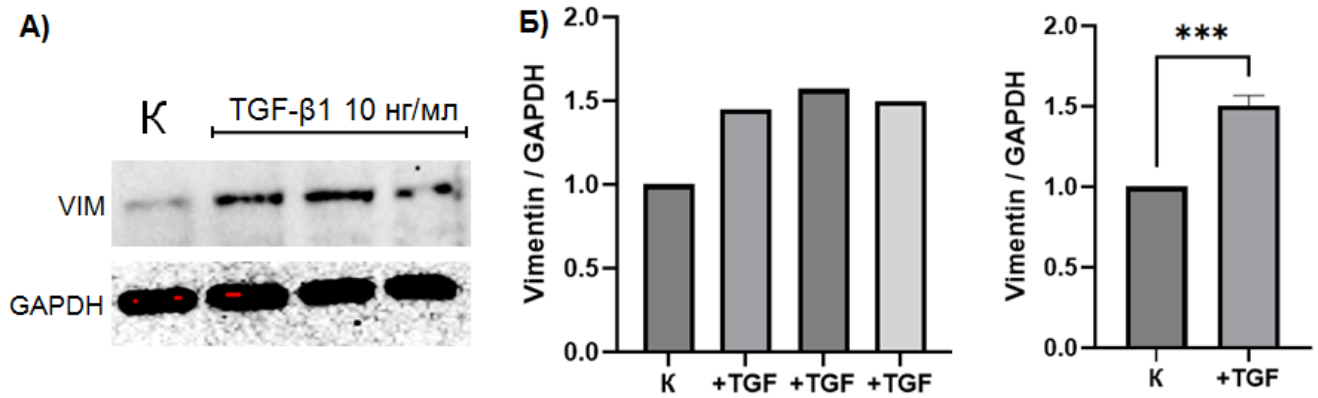


Рисунок 29 – Результаты определения относительного количества мезенхимального маркера VIM в первичных культурах HUVEC при воздействии TGF-β1 (10 нг/мл) в течение 72 ч

- А) изменение относительного количества VIM относительно контроля
 Б) результаты денситометрического анализа, выполненного при помощи программного обеспечения ImageLab

Примечание – статистически значимое отличие от контроля, *** $p = 0,0001$

Индукция EndMT при воздействии TGF-β1 (10 нг/мл) в течение 72 ч подтверждается статистически значимым снижением эндотелиальных маркеров (CD31 и vWF) и повышением мезенхимальных маркеров (FN и VIM) в первичных культурах HUVEC. Из полученных результатов следует, что TGF-β1 достоверно индуцирует EndMT.

3.4.3. Изменение морфологии первичных культур HUVEC при воздействии TGF-β1

Воздействие TGF-β1 на первичные культуры HUVEC, приводило к изменению клеточной морфологии, что выражалось в потере характерных эндотелиальных признаков (Рисунок 30).

Эндотелиальные клетки трансформировались из структурированного монослоя в удлиненные, веретенообразные фибробластоподобные клетки. Также, отмечалась потеря компактности расположения клеток, апикально-базальной полярности и межклеточных соединений. Реорганизация цитоскелета на

фибробластоподобную позволяет клеткам приобретать миграционные, инвазивные свойства.

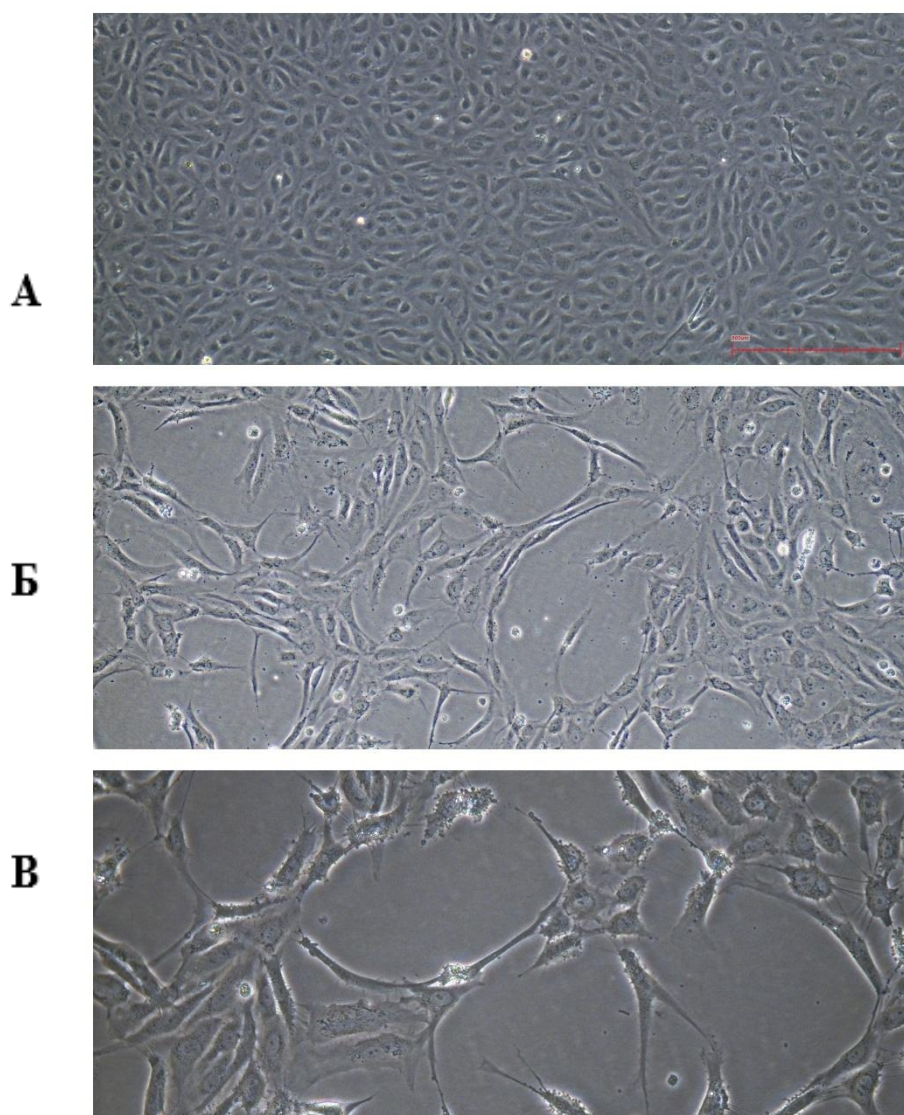


Рисунок 30 – Изменение морфологии первичных культур HUVEC после моделирования EndMT

- А) типичный вид монослоя первичных культур HUVEC в виде «булыжной мостовой», ув. $\times 100$;
- Б) HUVEC с измененной веретенообразной морфологией при моделировании EndMT, ув. $\times 100$;
- В) HUVEC с измененной веретенообразной морфологией при моделировании EndMT, ув. $\times 200$

Функциональные и фенотипические изменения клеток во время EndMT являются ключевыми для этого процесса, следовательно, изменение

морфологических характеристик становится убедительным показателем для определения EndMT.

Моделирование EndMT вызывало смену типичного характера роста эндотелиоцитов в виде «булыжной мостовой» на отростчатую, свойственную для мезенхимальных клеток (Таблица 5).

Таблица 5 – Морфологические и структурные изменения эндотелиоцитов в состоянии EndMT [158–161]

Изменение	Описание
Трансформация формы	Смена формы с плоской, овальной на вытянутую, веретенообразную (фибробластоподобный фенотип).
Потеря межклеточных соединений	Разрыв межклеточных контактов (плотные: клаудин, окклюдин; адгезионные: VE-кадгерин), потеря характерного монослоя «булыжной мостовой».
Сдвиг полярности	Утрата апикально-базальной полярности, приобретение передне-задней поляризации, усиление миграции и подвижности.
Реорганизация цитоскелета	Перестройка актинового цитоскелета, изменение формы клеток, повышение миграционного и инвазивного потенциала.
Производство ВКМ	Увеличение синтеза мезенхимальных маркеров (например, α -SMA, виментин, фибронектин), усиление отложения внеклеточного матрикса.

3.4.5. Определение маркеров мезенхимального профиля (FN и VIM)

Иммуноцитохимическое исследование после моделирования TGF- β 1-индуцированного EndMT в первичных культурах HUVEC подтвердило наличие мезенхимальных маркеров FN (Рисунок 31) и VIM (Рисунок 32).

На изображении показано иммунопозитивное окрашивание на FN в виде зеленого рассеянного или сетчатого свечения, ядра (синий) окрашены DAPI (Рисунок 31). Фибронектин – гликопротеин внеклеточного матрикса, который связывается с мембранными рецепторными белками, наиболее часто обнаруживается в период эмбрионального развития, а также ремоделирования тканей. Фибронектин играет важную роль в клеточной адгезии, росте, миграции, дифференцировке [162].

VIM-положительное окрашивание характеризуется ярко-зеленым окрашиванием цитоплазмы клеток, ядра (синий) окрашены DAPI (Рисунок 32). Виментин является основным промежуточным филаментом фибробластов и мезенхимальных клеток. Виментин прикрепляется к ядру, эндоплазматической сети, митохондриям и участвует в направлении движения клеток, ориентации и поляризации комплекса Гольджи на фронте миграции. [163].

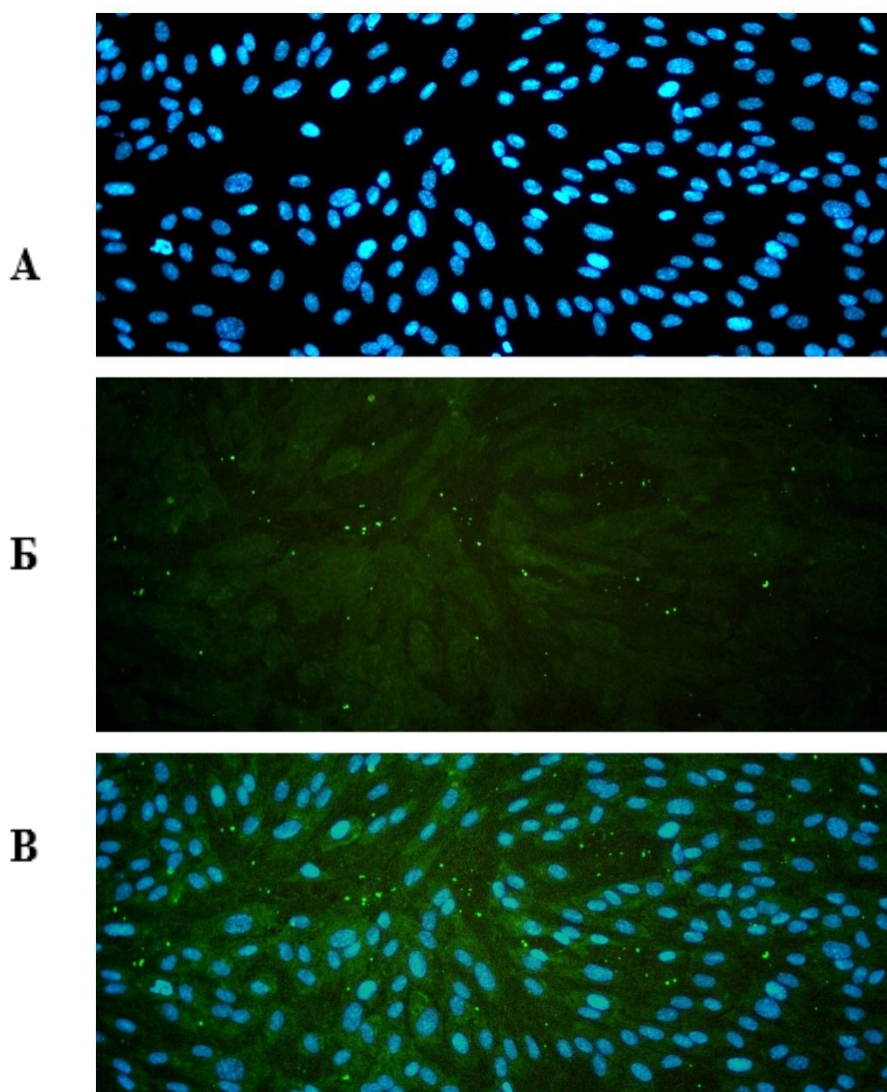


Рисунок 31 – Результаты иммуноцитохимического исследования первичных культур HUVEC с использованием антител к FN

А) окрашивание ядер клеток флуоресцентным красителем DAPI, ув. $\times 200$;

Б) окрашивание цитоплазмы клеток антителами к FN, ув. $\times 200$;

В) двойная экспозиция изображений демонстрирует расположение окрашивания клеточных структур относительно друг друга, ув. $\times 200$

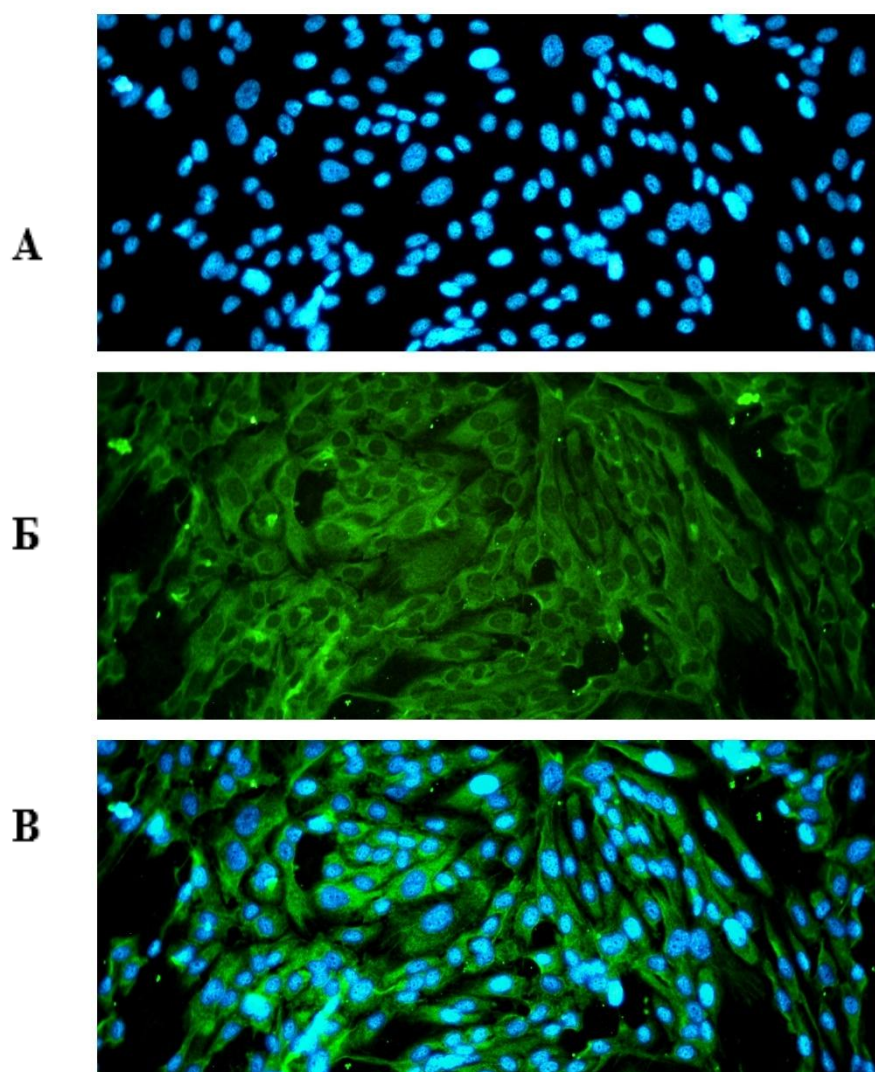


Рисунок 32 – Результаты иммуноцитохимического исследования первичных культур HUVEC с использованием антител к VIM после моделирования EndMT

- А) окрашивание ядер клеток флуоресцентным красителем DAPI, ув. $\times 200$;
 Б) окрашивание цитоплазмы клеток антителами к VIM, ув. $\times 200$;
 В) двойная экспозиция изображений демонстрирует расположение окрашивания клеточных структур относительно друг друга, ув. $\times 200$

Эндотелиально-мезенхимальный переход моделировали путем инкубации HUVEC с рекомбинантным человеческим TGF β -1. Воздействие TGF- β 1 приводило к снижению эндотелиальных маркеров (CD31 и vWF) и повышению мезенхимальных маркеров (FN и VIM). Следовательно, TGF- β 1 (10 нг/мл) в течение 72 ч достоверно индуцирует EndMT в первичных культурах HUVEC.

3.5. Влияние пероксинитрита на показатели маркеров EndMT

3.5.1. Изменения эндотелиальных маркеров (CD31 и vWF) под действием пероксинитрита

Инкубация первичных культур HUVEC с пероксинитритом приводила к повышению относительного количества CD31 при воздействии концентраций 1, 10, 50, 100 и 250 мкМ на 35,8% ($p=0,002$), 39,6% ($p=0,007$), 37,1% ($p=0,0014$), 36,7% ($p=0,0015$), 42,4% ($p=0,0004$) соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 33). Концентрация 500 мкМ не оказала статистически значимых изменений. При межгрупповых сравнениях статистически значимых различий выявлено не было.

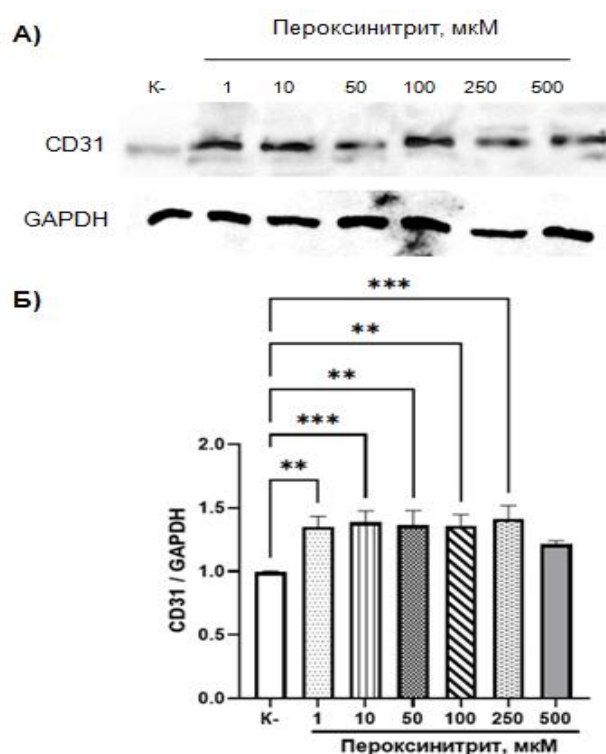


Рисунок 33 – Результаты определения относительного количества эндотелиального маркера CD 31 в первичных культурах HUVEC при воздействии различных концентраций пероксинитрита в течение 2 часов

А) изменение относительного количества эндотелиального маркера CD 31 относительно контроля

Б) результаты денситометрического анализа, выполненного при помощи программного обеспечения ImageLab

Примечание – статистически значимые отличия от контроля, ** $p < 0,005$; *** $p = 0,0005$

Относительное количество vWF повышалось при воздействии пероксинитрита в концентрации 1, 10, 50 и 100 мкМ на 36% ($p=0,0005$), 35% ($p=0,0008$), 29% ($p=0,0048$), 32% ($p=0,0016$) соответственно по сравнению с контролем. При высоких концентрациях 250 и 500 мкМ отмечалось статистически не значимое снижение исследуемого маркера. При межгрупповых сравнениях уровень vWF значимо снижался между группами 1 и 250 мкМ на 29,4% ($p=0,0002$), 1 и 500 мкМ на 27,2% ($p=0,0004$), 10 и 250 мкМ на 28,9% ($p=0,0003$), 10 и 500 мкМ на 26,7% ($p=0,0006$), 50 и 250 мкМ на 25,6% ($p=0,0016$), 50 и 500 мкМ на 23,3% ($p=0,0036$), 100 и 250 мкМ на 27,3% ($p=0,0005$), 100 и 500 мкМ на 25% ($p=0,0012$) наблюдалось снижение определяемого маркера относительно повышения концентрации пероксинитрита (Рисунок 34).

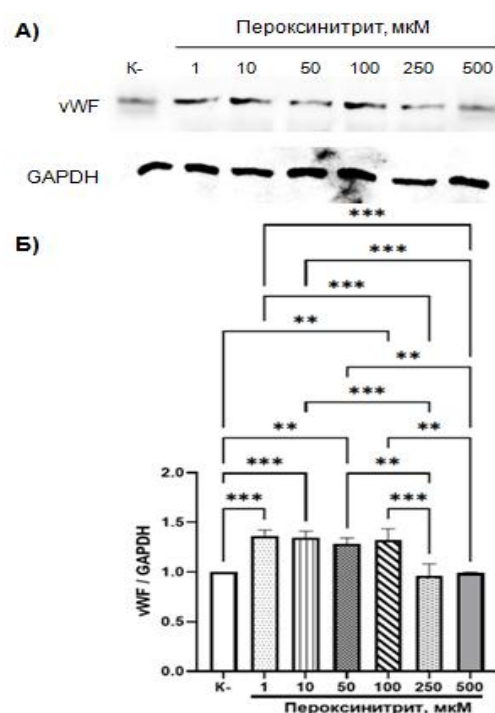


Рисунок 34 – Результаты определения относительного количества эндотелиального маркера vWF в первичных культурах HUVEC при воздействии различных концентраций пероксинитрита в течение 2 часов

А) изменение относительного количества эндотелиального маркера vWF относительно контроля

Б) результаты денситометрического анализа, выполненного при помощи программного обеспечения ImageLab

Примечание – статистически значимые отличия от контроля, ** $p < 0,005$; *** $p = 0,0005$

По данным литературы, пероксинитрит повышает активность эндотелиальных маркеров, например, индуцибельная синтаза оксида азота (iNOS), аргиназа, и структурных маркеров дисфункции, вызывая окислительный/нитрозативный стресс, который активирует провоспалительные пути, такие как NF-κB. Он выступает сигнальной молекулой клеточной дисфункции, стресса эндоплазматического ретикулума, что запускает компенсаторные механизмы, например, повышение уровня VEGF, в ответ на повреждение сосудов (Таблица 6).

Таблица 6 – Основные механизмы повышения активности эндотелиальных маркеров при воздействии пероксинитрита [164–167]

Механизм	Описание
Активация NF-κB	Пероксинитрит активирует путь ядерного фактора каппа-B, что приводит к увеличению синтеза iNOS и COX-2.
Модуляция сигнального каскада	Пероксинитрит индуцирует фосфорилирование сигнальных белков и стимулирует синтез VEGF через путь STAT3, способствуя дисфункции и ремоделированию сосудов.
Стресс эндоплазматического ретикулума (ЭР)	Запуск стресса ЭР, повышает экспрессию шаперонов (например, GRP78) и происходит нитрозилирование белков.
Повышение синтеза аргиназы	Индукция синтеза аргиназы I и II, приводит к разобщению eNOS и ухудшению функции эндотелия.

3.5.2. Изменения мезенхимальных маркеров (FN и VIM) под действием пероксинитрита

Количество фибронектина снижалось на всем диапазоне концентраций: при 1 мкМ на 35,7% ($p=0,002$), 10 мкМ на 37% ($p=0,0015$), 50 мкМ на 36% ($p=0,0019$), 100 мкМ на 24% ($p=0,044$), 250 мкМ на 44,7% ($p=0,0002$), 500 мкМ на 59,3% ($p<0,0001$) относительно контроля. При межгрупповых сравнениях уровень фибронектина статистически значимо снижался между группами 1 и 500 мкМ на 36,7% ($p=0,0458$), 100 и 500 мкМ на 46,5% ($p=0,0022$) (Рисунок 35).

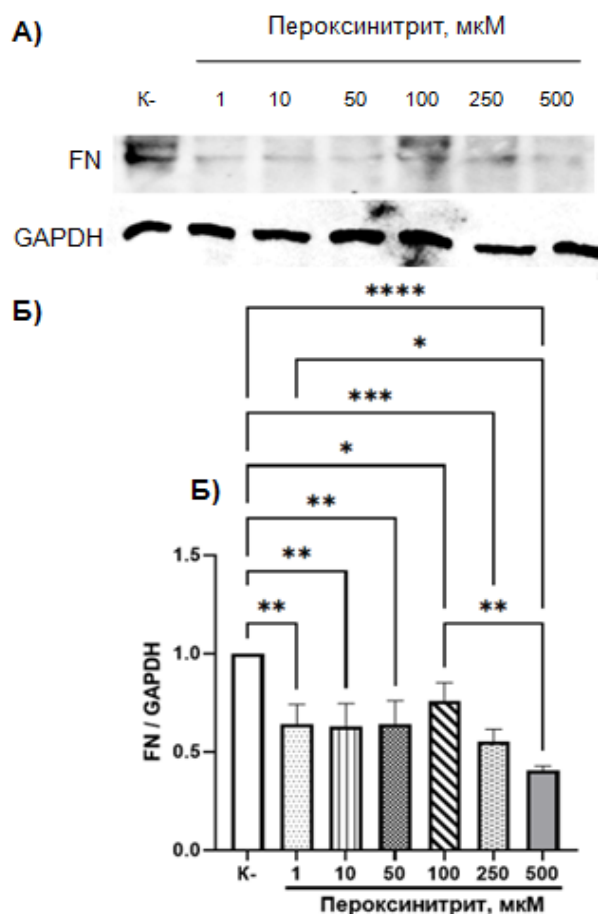


Рисунок 35 – Результаты определения относительного количества мезенхимального маркера FN в первичных культурах HUVEC при воздействии различных концентраций пероксинитрита в течение 2 часов

А) изменение относительного количества FN относительно контроля

Б) результаты денситометрического анализа, выполненного при помощи программного обеспечения ImageLab

Примечание – статистически значимые отличия от контроля, * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,0001$

Количество виментина снижалось при концентрации 1мкМ на 15% ($p < 0,0001$), 10 мкМ на 44% ($p < 0,0001$), 50 мкМ на 34% ($p < 0,0001$), 250 мкМ на 27% ($p < 0,0001$), 500 мкМ на 41% ($p < 0,0001$) относительно контроля. При концентрации 100 мкМ уровень повышался статистически не значительно по сравнению с контролем. При межгрупповых сравнениях уровень виментина снижался между концентрациями 1 и 10 мкМ на 34,1% ($p < 0,0001$), 1 и 50 мкМ на 22,4% ($p < 0,0001$), 1 и 250 мкМ на 14,1% ($p < 0,0001$), 1и 500 мкМ на 30,6% ($p < 0,0001$). Между концентрациями 1 и 100 мкМ было выявлено повышение на

18,8% ($p < 0,0001$). При сравнении также отмечалось повышение уровня маркера между концентрациями 10 и 50 мкМ на 17,9% ($p < 0,0001$), 10 и 100 мкМ на 80,4% ($p < 0,0001$), 10 и 250 мкМ на 30,4% ($p < 0,0001$), 10 и 500 мкМ на 5,4% ($p < 0,0236$), 50 и 100 мкМ на 53% ($p < 0,0001$), 50 и 250 мкМ на 10,6% ($p < 0,0001$). Также отмечалось снижение при сравнении групп 50 и 500 мкМ на 10,6% ($p < 0,0001$), 100 и 250 мкМ на 27,7% ($p < 0,0001$), 100 и 500 мкМ на 41,6% ($p < 0,0001$) и 250 и 500 мкМ на 19,2% ($p < 0,0001$) (Рисунок 36).

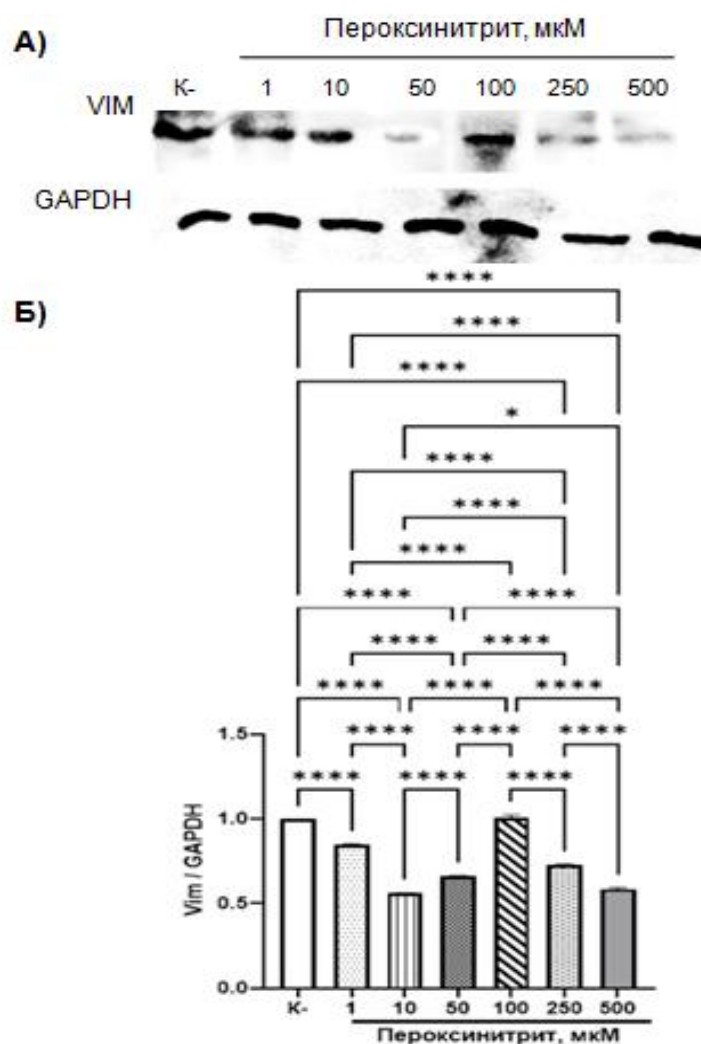


Рисунок 36 – Результаты определения относительного количества мезенхимального маркера VIM в первичных культурах HUVEC при воздействии различных концентраций пероксинитрита в течение 2 часов

А) изменение относительного количества VIM относительно контроля

Б) результаты денситометрического анализа, выполненного при помощи программного обеспечения ImageLab

Примечание – статистически значимые отличия от контроля, * $p < 0,05$; **** $p = 0,0001$

Полученные результаты говорят о том, что пероксинитрит оказывает значимое влияние на уровень исследуемых маркеров. Воздействие пероксинитрита в различных концентрациях на первичные культуры эндотелиальных клеток после индукции EndMT привело к статистически значимому повышению эндотелиальных маркеров и снижению мезенхимальных маркеров, что может свидетельствовать о том, что пероксинитрит является новым потенциальным ингибитором эндотелиально-мезенхимального перехода.

Пероксинитрит вызывает снижение мезенхимальных маркеров, действуя как агент нитрозативного стресса, который индуцирует повреждение клеток, ингибирует критически важные сигнальные пути и запускает клеточную смерть. В то время как умеренное количество активных форм кислорода часто способствует развитию мезенхимальных характеристик, высокие уровни пероксинитрита приводят к клеточной дисфункции (Таблица 7).

Таблица 7 – Ключевые механизмы снижения мезенхимальных маркеров [168–170]

Механизм	Описание
Ингибирование сигнальных путей	Подавление ключевых путей, например, PI3K/Akt, которые поддерживают мезенхимальные характеристики. Это происходит за счёт нитрозилирования тирозина, что препятствует его фосфорилированию.
Нарушение TGF- β сигнализации	Нарушение работы TGF- β – основного стимулятора мезенхимальных маркеров.
Повреждение и деградация белков	Прямое окислительное повреждение и нитрозилирование белков, что приводит к их деградации.
Инактивация MMP-2	В определённых моделях (например, фиброз сердца) пероксинитрит укорачивает и инактивирует матриксную металлопротеиназу-2 (MMP-2), снижая способность клеток к переходу в мезенхимальный фенотип.
Индукция апоптоза	Высокие концентрации пероксинитрита вызывают выраженный нитрозативный стресс, приводящий к дисфункции клеток и апоптозу, что подавляет их способность поддерживать мезенхимальное состояние.

Хотя низкий уровень нитрозативного стресса может способствовать мезенхимальной трансформации, интенсивное нитрозилирование и окислительное повреждение, вызванные высокими концентрациями

пероксинитрита, приводят к снижению мезенхимальных маркеров, часто уменьшая жизнеспособность клеток или ингибируя процесс трансформации.

3.6. Влияние пероксинитрита на TGF- β 1-индуцированный EndMT

3.6.1. Изменения эндотелиальных маркеров (CD31 и vWF) под воздействием пероксинитрита на EndMT

При инкубации первичных культур HUVEC с TGF- β 1 отмечалось снижение уровня CD31 на 45,8 % и vWF на 24,3 % по сравнению с группой интактных эндотелиоцитов (К-). Сочетанное последовательное воздействие TGF- β 1 и пероксинитрита вызвало повышение CD31 относительно (К-) при концентрациях 1, 10, 50, 100, 250, 500 мкМ на 122,8%; 123,6%; 108,5%; 96,7%; 19,8%; 12,1% соответственно. Сочетанное последовательное воздействие TGF- β 1 и пероксинитрита вызвало повышение CD31 относительно (К+) при концентрациях 1, 10, 50, 100, 250, 500 мкМ на 168,6%; 169,4%; 154,3%; 142,6%; 65,6%; 57,9% соответственно (Рисунок 37).

При воздействии TGF- β 1 и пероксинитрита 1 – 250 мкМ уровень vWF статистически значимо не изменялся, а при 500 мкМ снижался на 34,8 % по сравнению с интактных эндотелиоцитов (К-). Сочетанное последовательное воздействие TGF- β 1 и пероксинитрита вызвало повышение vWF относительно (К+): при концентрациях 1, 10, 50, 100 и 250 мкМ отмечали возрастание на 23,1%, 31,3%, 24,4%, 29,4% и 31,9% и не изменялось при 500 мкМ (Рисунок 38).

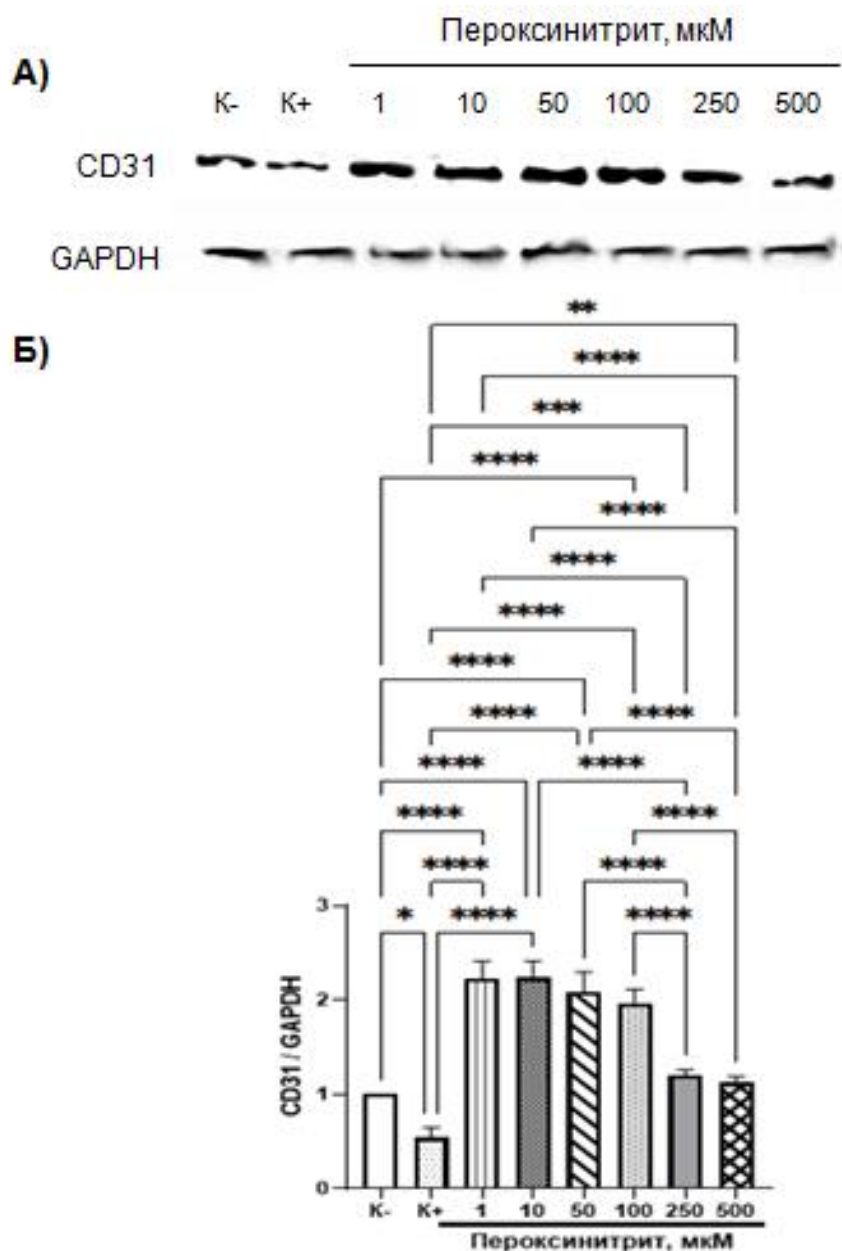


Рисунок 37 – Результаты определения относительного количества эндотелиального маркера CD 31 в лизатах клеток при индукции EndMT и воздействии пероксинитрита

отрицательный контроль (K-) – интактные первичные культуры HUVEC
 положительный контроль (K+) – первичные культуры HUVEC после воздействия TGF- β 1 (индукция EndMT)
 опытные группы – первичные культуры HUVEC после воздействия TGF- β 1 и пероксинитрита

А) изменение относительного количества CD 31 относительно контроля

Б) результаты денситометрического анализа, выполненного при помощи программного обеспечения ImageLab

Примечание – статистически значимые отличия от контроля, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

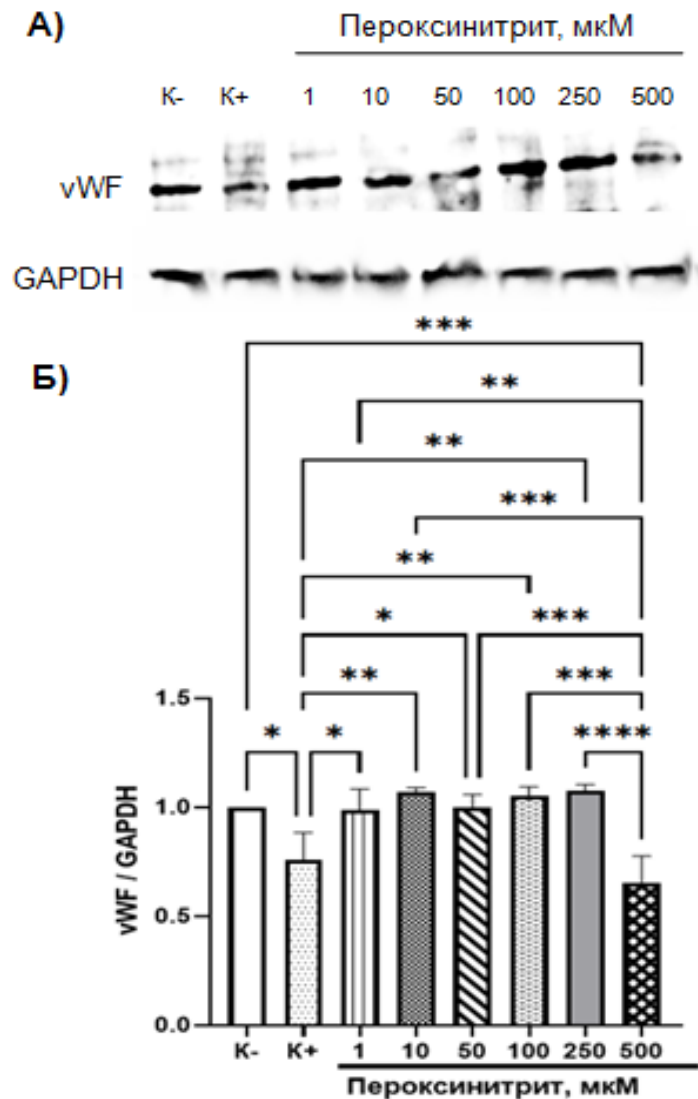


Рисунок 38 – Результаты определения относительного количества эндотелиального маркера vWF в лизатах клеток при индукции EndMT и воздействии пероксинитрита

отрицательный контроль (K-) – интактные первичные культуры HUVEC
 положительный контроль (K+) – первичные культуры HUVEC после воздействия TGF- β 1 (индукция EndMT)
 опытные группы – первичные культуры HUVEC после воздействия TGF- β 1 и пероксинитрита

А) изменение относительного количества vWF относительно контроля

Б) результаты денситометрического анализа, выполненного при помощи программного обеспечения ImageLab

Примечание – статистически значимые отличия от контроля, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

Воздействие пероксинитрита снижает уровень эндотелиальных маркеров в присутствии TGF- β 1, действуя как синергический медиатор эндотелиально-

мезенхимального перехода. Пероксинитрит ускоряет EndMT, усиливая фибротический сигнал и подавляя экспрессию генов, специфичных для эндотелия (Таблица 8).

Таблица 8 – Ключевые механизмы снижения эндотелиальных маркеров при воздействии пероксинитрита на TGF- β 1 [155, 171–173]

Механизм	Описание
Активация пути RhoA/ROCK	Пероксинитрит значительно увеличивает активность этого пути. Активная киназа RhoA снижает синтез eNOS и способствует потере эндотелиальных фенотипических маркеров.
Усиление TGF- β сигнализации	Окислительный/нитрозативный стресс, создаваемый пероксинитритом, активирует путь TGF- β 1. Это приводит к одновременной потере эндотелиальных характеристик и приобретению мезенхимального фенотипа.
Разобщение eNOS	Пероксинитрит окисляет тетрагидробиоптерин (кофактор eNOS), вызывая разобщение фермента. В результате eNOS начинает производить супероксид вместо оксида азота, что усиливает окислительный стресс и повреждение клеточных структур.
Прямая модификация клеточных структур	Пероксинитрит вызывает нитрозилирование белков, нарушая структуру эндотелиальных клеток (например, разрушает caveолы и локализацию eNOS).

При сосудистых заболеваниях, а также диабете или гипергликемии, повышенный уровень супероксида взаимодействует с оксидом азота, образуя пероксинитрит. В сочетании с сигнальным путем TGF- β 1 такая среда заставляет эндотелиальные клетки терять свою барьерную функцию и превращаться в активированные миофибробласты, что приводит к снижению продукции эндотелиальных маркеров.

3.6.2. Изменения мезенхимальных маркеров (FN и VIM) при воздействии пероксинитрита на EndMT

Воздействие TGF- β 1 вызывало повышение уровня FN на 38,8% и VIM на 39,8% по сравнению с группой интактных эндотелиоцитов (К-).

Сочетанное последовательное воздействие TGF- β 1 и пероксинитрита в конечных концентрациях вызвало повышение FN относительно (К-): при концентрациях 1, 10, 50 и 500 мкМ уровень FN статистически значимо не

изменялся, а при концентрациях 100 и 250 мкМ отмечали возрастание на 42,9% и 20,6% соответственно. Сочетанное последовательное воздействие TGF- β 1 и пероксинитрита вызвало понижение FN относительно (K+) при концентрациях 1, 10, 50 и 500 мкМ на 36%, 25%, 20% соответственно (Рисунок 39).

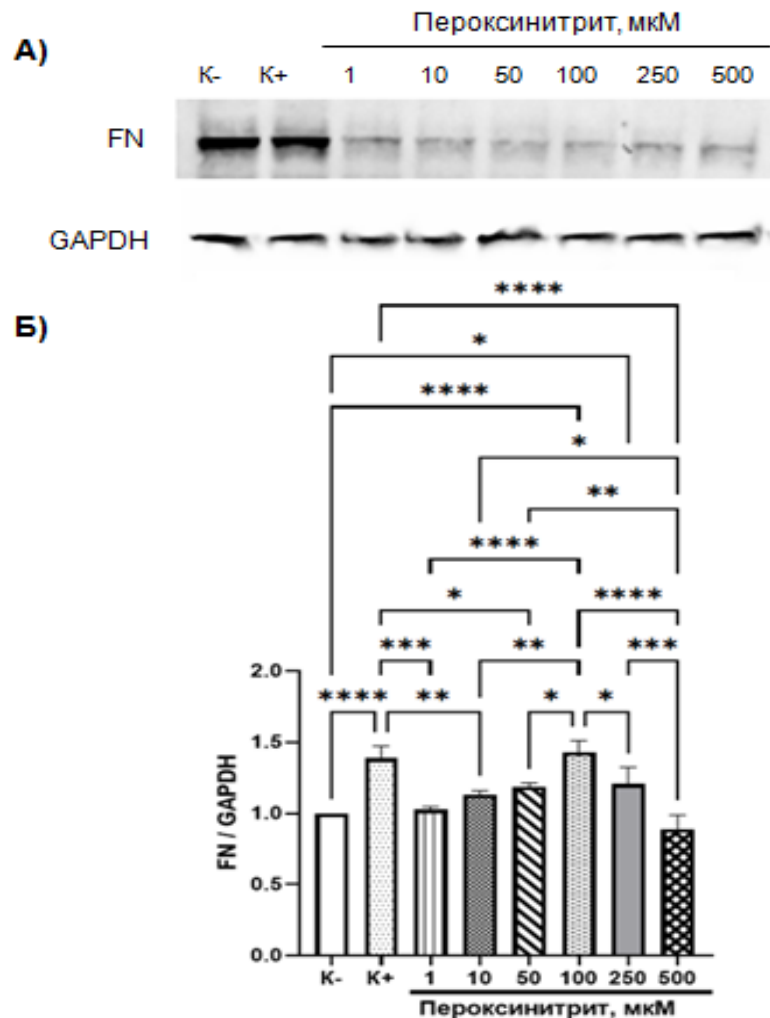


Рисунок 39 – Результаты определения относительного количества мезенхимального маркера FN в лизатах клеток при индукции EndMT и воздействии пероксинитрита

отрицательный контроль (K-) – интактные первичные культуры HUVEC

положительный контроль (K+) – первичные культуры HUVEC после воздействия TGF- β 1 (индукция EndMT)

опытные группы – первичные культуры HUVEC после воздействия TGF- β 1 и пероксинитрита

А) изменение относительного количества vWF относительно контроля

Б) результаты денситометрического анализа, выполненного при помощи программного обеспечения ImageLab

Примечание – статистически значимые отличия от контроля, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

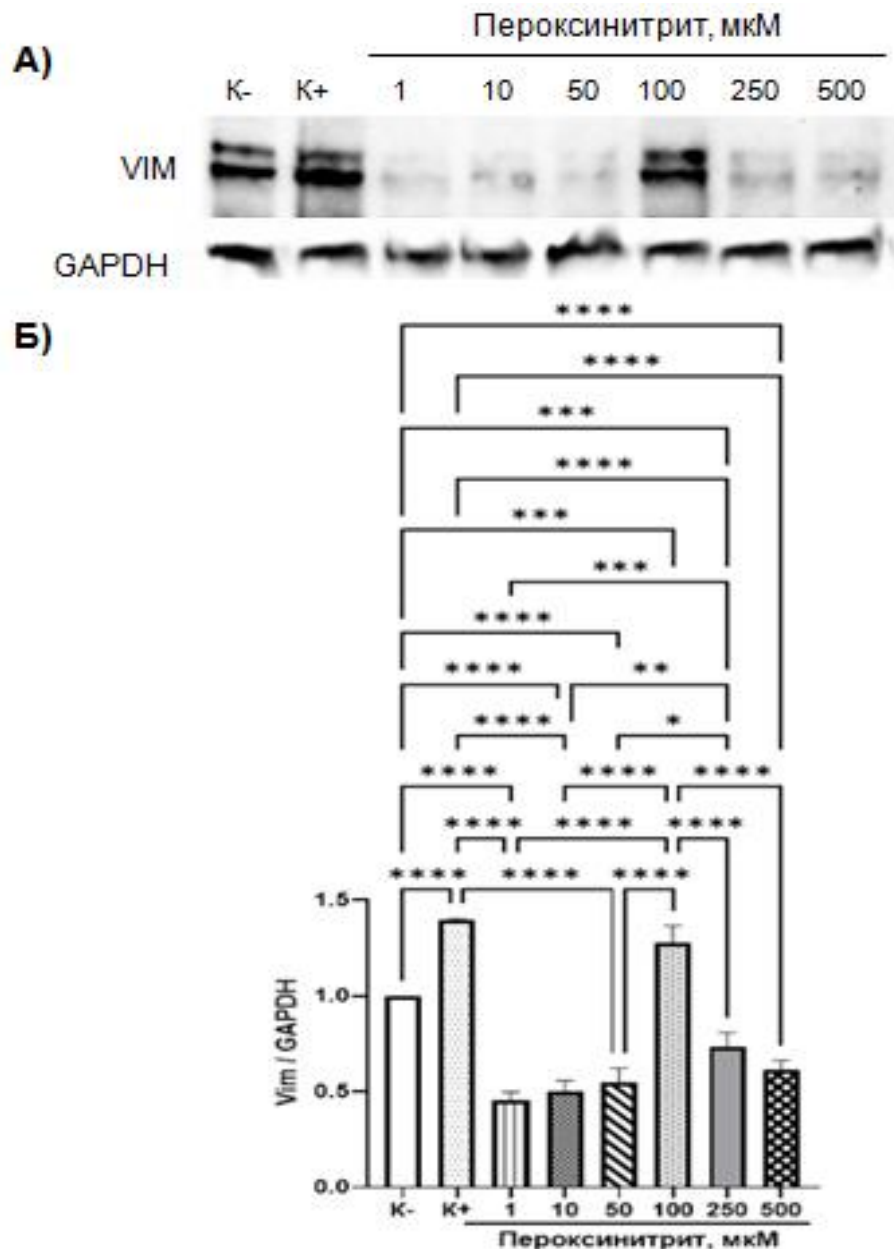


Рисунок 40 – Результаты определения относительного количества мезенхимального маркера VIM в лизатах клеток при индукции EndMT и воздействии пероксинитрита ($M \pm SD$)

отрицательный контроль (K-) – интактные первичные культуры HUVEC

положительный контроль (K+) – первичные культуры HUVEC после воздействия TGF- β 1 (индукция EndMT)

опытные группы – первичные культуры HUVEC после воздействия TGF- β 1 и пероксинитрита

А) изменение относительного количества VIM относительно контроля

Б) результаты денситометрического анализа, выполненного при помощи программного обеспечения ImageLab

Примечание – статистически значимые отличия от контроля, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Сочетанное последовательное воздействие TGF- β 1 и пероксинитрита вызвало снижение VIM относительно (K⁻): при концентрациях 1, 10, 50, 250, и 500 мкМ на 54,3%, 49,8%, 45,5%, 26,4%, 38,8% соответственно. При концентрации 100 мкМ наблюдалось повышение VIM на 27,9%. Сочетанное последовательное воздействие TGF- β 1 и пероксинитрита вызвало понижение VIM относительно (K⁺) при концентрациях 1, 10, 50, 250, и 500 мкМ на 94,1%, 89,6%, 85,3%, 66,2%, 78,7% соответственно. При концентрации 100 мкМ наблюдалось повышение VIM на 11,8% (Рисунок 40).

Сочетанное последовательное воздействие TGF- β 1 и пероксинитрита на первичные культуры HUVEC вызывало повышение уровней эндотелиальных маркеров (CD31, vWF) и снижение уровней мезенхимальных маркеров (FN и VIM), что подтверждает ингибирующее воздействие пероксинитрита на EndMT.

Пероксинитрит и SIN-1 значительно усиливали продукцию альфа-SMA по сравнению с контролем в зависимости от концентрации ($p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно). Пероксинитрит значительно увеличивал продукцию десмина и TGF- β 1 ($p < 0,01$). Пероксинитрит усиливал транслокацию NF κ B в ядро, что было подтверждено иммуноцитокрашиванием и иммуноблоттингом. Усиленная пероксинитритом продукция альфа-SMA блокировалась ингибиторами NF-каппаB, MG132 и фенэтиловым эфиром кофейной кислоты (CAPE), а также антителами к TGF- β 1. CAPE полностью ингибировал усиленное пероксинитритом высвобождение TGF- β 1. Продукция фибронектина и коллагена I значительно увеличивалась под действием пероксинитрита ($p < 0,01$) и ингибировалась антителами к TGF- β 1. Эти результаты свидетельствуют о том, что АФА может влиять на дифференцировку в миофибробласты и избыточное производство внеклеточного матрикса через зависимый от NF-каппаB- TGF- β 1 путь. [168].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

EndMT является важным участником эмбрионального развития, однако, а в постнатальном периоде становится патогенетическим звеном развития заболеваний. Поэтому изучение данного процесса вызывает высокий научный интерес и обуславливает поиск экспериментальных моделей для его исследования. Моделирование EndMT *in vitro* является перспективной способом для изучения молекулярных механизмов.

Нитрозативный стресс взаимодействуют с основными провоспалительными, метаболическими путями и механизмами клеточной гибели, играет важную роль в развитии сложных биохимических и структурных изменений, связанных с метаболическими, сердечно-сосудистыми и фиброзными заболеваниями. Поэтому изучение влияния НС представляет не только теоретический, но и практический интерес, нацеленный на повышение эффективности и безопасности терапии.

Пероксинитрит, как активная форма азота, является одним из самых сильных окислителей в организме, который в зависимости от условий играет двойственную роль: с одной стороны – токсический агент, вызывающий гибель клеток, с другой – сигнальная молекула, участвующая в регуляции клеточного метаболизма. Образование пероксинитрита играет важное значение в патогенезе различных заболеваний [22].

Объектом исследования для изучения влияния нитрозативного стресса на EndMT были выбраны первичные культуры эндотелиоцитов HUVEC. HUVEC – это первичные клетки, выделенные из вены пуповины человека, которые широко используются для изучения сердечно-сосудистой системы в медицинских и биологических исследованиях. На протяжении первых пассажей HUVEC сохраняют характеристики эндотелиальных клеток *in vivo*, и являются доступной клеточной модельной системой для исследования биологии сосудов, эндотелиальной дисфункции, патофизиологии заболеваний, и действия различных лекарственных препаратов [174].

Результаты проведенных экспериментальных исследований на первичных культурах HUVEC указывают на то, что воздействие пероксинитрита приводит к нитрозативному стрессу, что выражается в повышении уровня NO, накоплении продуктов нитрозилирования – 3-нитротиозина и битирозина. В данном исследовании было подтверждена эффективность моделирования нитрозативного стресса с использованием пероксинитрита.

Воздействие TGF- β 1 (10 нг/мл) в течение 72 ч на первичные культуры HUVEC индуцирует EndMT, что подтверждается снижением эндотелиальных маркеров (CD31 и vWF) и повышением мезенхимальных маркеров (FN и VIM).

Инкубация с различными концентрациями пероксинитрита приводит к значительному повышению уровня эндотелиальных маркеров (CD31, vWF) и снижению уровня мезенхимальных маркеров (FN и VIM) в первичных культурах HUVEC.

Сочетанное последовательное воздействие TGF- β 1 и пероксинитрита на первичные культуры HUVEC вызывает повышение эндотелиальных маркеров (CD31, vWF) и снижение мезенхимальных маркеров (FN и VIM), что также подтверждает ингибирующее воздействие пероксинитрита на EndMT.

В представленном исследовании воздействие пероксинитрита ингибировало TGF- β -индуцированный EndMT в первичных культурах эндотелиальных клеток HUVEC. Схематично полученные результаты, потенциальные механизмы и сигнальные пути, лежащие в основе влияния пероксинитрита на EndMT, представлены на Рисунке 41.

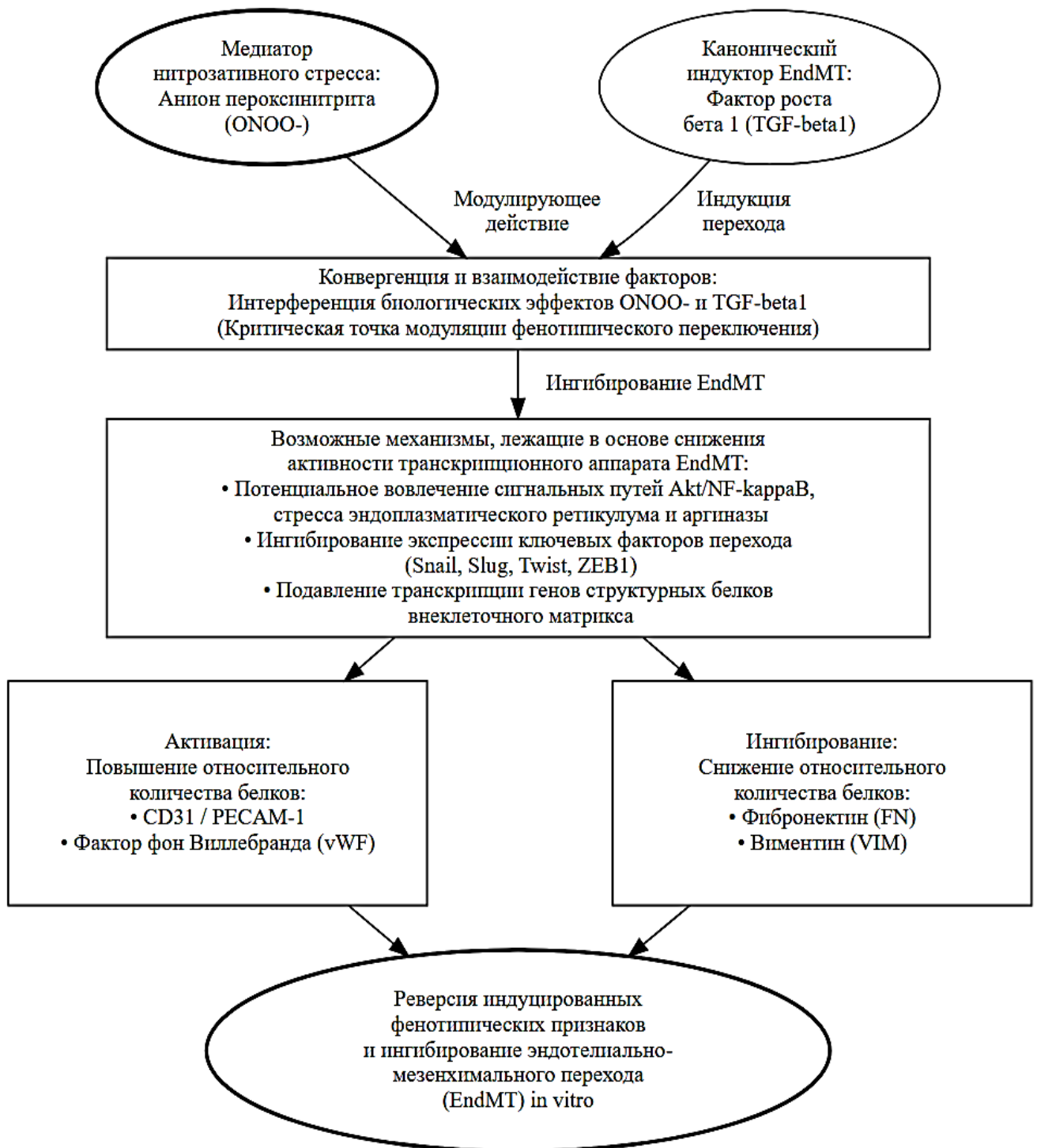


Рисунок 41 – Блок-схема, представляющая основные результаты изучения влияния пероксинитрита на EndMT, потенциальные механизмы и сигнальные пути, лежащие в его основе

Эндотелиально-мезенхимальный переход не ограничивается эмбриональным развитием и может также происходить в эндотелиальных клетках взрослого организма. На ранних стадиях эмбрионального развития позвоночных

тотипотентные клетки проходят путь полной дифференцировки от состояния стволовости до высокоспециализированных клеток, выполняющих определенные функции в различных тканях. Процесс клеточной дифференциации чрезвычайно сложен и точно запрограммирован, он идет по многочисленным молекулярным сигналам и путям, не зависящим от последовательности или репликации ДНК.

Менделевские законы наследования постулировали о полной стабильности дифференцированных клеток и сохранении исходного фенотипа на протяжении всей жизни организма. Новая концепция «эпигенетического ландшафта», сформулированная Уоддингтоном изменила представления о реализации генетической информации. Было показано, что процесс клеточной трансдифференцировки не требует репликации ДНК и опосредуется комбинированным эффектом активации ранее неактивных генов и/или подавления генов, которые экспрессировались в клетках исходного фенотипа [175]. Эпигенетические модификации вызывают глубокие изменения в структуре и функциях клеток, задействуют множество молекулярных путей и разнообразных механизмов. Молекулы, отвечающие за эти эффекты, весьма гетерогенны и включают различные виды некодирующих РНК, гистонов и других регуляторных белков. Эпигенетические эффекты модулируют белок-белковые взаимодействия, способные точно регулировать уровни экспрессии генов, которые имеют решающее значение для экспрессии и поддержания дифференцированного состояния, а также для фенотипического перехода полностью дифференцированных клеток в клетки с отличным фенотипом [176].

Изучение реакции нитрозилирования как посттрансляционной модификации белка и EndMT в контексте клеточной трансдифференцировки становится интересным с точки зрения взаимовлияния данных процессов – суммации изменчивости живого под воздействием различных стимулов и адаптации к изменениям условий среды.

ВЫВОДЫ

1. Моделирование нитрозативного стресса при помощи пероксинитрита вызывает снижение метаболической активности первичных культур HUVEC при концентрации 250 мкМ.

2. Воздействие пероксинитрита в концентрациях 10, 50, 100, 250 и 500 мкМ в течение 2 часов позволяет эффективно моделировать нитрозативный стресс в первичных культурах HUVEC, что подтверждается статистически значимым повышением уровней оксида азота II и 3-нитротирозина в лизатах клеток.

3. Воздействие человеческого рекомбинантного TGF- β 1 в концентрации 10 нг/мл в течение 3 суток позволяет эффективно моделировать эндотелиально-мезенхимальный переход в первичных культурах HUVEC, что подтверждается значимым снижением относительного количества эндотелиальных маркеров CD31, vWF и повышением относительного количества мезенхимальных маркеров FN, VIM в лизатах клеток.

4. Пероксинитрит способствует достоверному повышению относительного количества эндотелиальных маркеров (в концентрациях 1-250 мкМ для CD31, 1-100 мкМ для vWF) и снижению мезенхимальных маркеров (в концентрациях 1-500 мкМ для FN и VIM) EndMT в клеточных лизатах первичных культур HUVEC.

5. Воздействие пероксинитрита в модели TGF β 1-индуцированного EndMT оказывает ингибирующее влияние на эндотелиально-мезенхимальный переход *in vitro*. Пероксинитрит значительно повышает относительное количество эндотелиальных (в концентрациях 1-500 мкМ для CD31, 1-250 мкМ для vWF) и снижает мезенхимальных маркеров (в концентрациях 1-500 мкМ для FN и VIM) в клеточных лизатах первичных культур HUVEC, находящихся в состоянии EndMT.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для моделирования TGF β 1-индуцированного EndMT в первичных культурах HUVEC рекомендуется использовать рекомбинантный человеческий TGF- β 1 в концентрации 10 нг/мл в течение 72 часов в экспериментах *in vitro*.

2. Пероксинитрит в концентрациях 10, 50, 100, 250 и 500 мкМ в течение 2 часов рекомендуется использовать для моделирования HC в первичных культурах HUVEC, что подтверждается дозозависимым изменением 3-НТ.

3. Определение 3-нитротирозина (вестерн-блот) и оксида азота при помощи флуоресцентных зондов (DAF-FM) рекомендуется использовать для подтверждения эффективности моделирования HC *in vitro*.

4. Для ингибирования TGF- β -индуцированного EndMT в первичных культурах HUVEC рекомендуется использовать пероксинитрит в концентрациях 10, 50, 100, 250 и 500 мкМ в течение 2 часов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Изучение сигнальных путей, посредством которых пероксинитрит оказывает ингибирующее воздействие на TGF- β -индуцированный EndMT *in vitro*.
2. Результаты данного диссертационного исследования являются обоснованием проведения дальнейших экспериментальных и клинических исследований по изучению ингибирующего воздействия пероксинитрита на патологические процессы, в основе которых лежит EndMT (фиброз, атеросклероз, рестеноз и пр.)
3. Нитрозативный стресс, индуцируемый пероксинитритом, может оказывать влияние на течение заболеваний, патологическим звеном которых является EndMT, что следует учитывать при планировании клинических исследований и экстраполяции этих данных в клиническую практику.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФА – активные формы азота

АФК – активные формы кислорода

ЛПС – липополисахариды

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

НС – нитрозативный стресс

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПФ – промежуточные филаменты

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ФДЭ – фосфодиэстераза

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ЭК – эндотелиальные клетки

3-НТ – 3-нитротирозин

Akt – семейство серин/треонинспецифичных протеинкиназ (Protein kinase B, PKB)

АМН – антимюллеров гормон (anti-Müllerian hormone)

BSA – бычий сывороточный альбумин (Bovine serum albumin)

BMP2-7 – костные морфогенетические белки (bone morphogenetic proteins)

ВН4 – тетрагидробиоптерин (tetrahydrobiopterin)

CD31 (PECAM-1) – молекула клеточной адгезии тромбоцитов и эндотелия 1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule 1)

COX – циклооксигеназа (cyclooxygenase)

DAF-FM – 4-амино-5-метиламино-2',7'-дифторфлуоресцеин диацетат (4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate)

DAPI – (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)

DPBS – фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко (Dulbecco's phosphate-buffered saline)

ECGM – питательная среда для эндотелиальных клеток (Endothelial Cell Growth medium)

- E-селектин – молекула клеточной адгезии, эндотелиальный селектин (E-selectin)
- EZH2 – энхансер гомолога 2 зеста (Enhancer of zeste homolog 2)
- EndMT – эндотелиально-мезенхимальный переход (endothelial-mesenchymal transition)
- EPICR – эндотелиальный рецептор протеина C (Endothelial protein C receptor).
- FN – фибронектин (Fibronectin)
- GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
- HCMEC – микрососудистые эндотелиальные клетки сосудов кожи человека (Human cutaneous microvascular endothelial cells)
- HIF-1 α – фактор, индуцируемый гипоксией 1-альфа (Hypoxia-inducible factor 1-alpha)
- HUVEC – эндотелиальные клетки вены пуповины человека (human umbilical vein endothelial cells)
- ICAM-1 – молекула межклеточной адгезии 1 (Intercellular adhesion molecule 1, CD54)
- IL1, IL6, IL8 – интерлейкин 1, 6, 8 (interleukin 1, 6, 8)
- LOSS – низкое колебательное напряжение сдвига (low oscillatory shear stress)
- MCP-1 – моноцитарный хемоаттрактантный белок 1 (Monocyte chemoattractant protein-1)
- NF κ B – ядерный транскрипционный фактор κ B (Nuclear factor κ B)
- NO-synthase – синтаза оксида азота (synthase of nitric oxide)
- ONOO⁻ – пероксинитрит (peroxynitrite)
- PAI-1 – ингибитор активации плазминогена 1 типа (plasminogen activator inhibitor-1)
- PECAM-1 – молекула клеточной адгезии тромбоцитов и эндотелиоцитов (platelet endothelial cell adhesion molecule 1)
- SDS – натрия додецилсульфат (sodium dodecyl sulfate)
- SNOG – S-нитрозоглутатион (S-nitrosoglutathione)

SM22 α – трансгелин, ассоциированный с гладкими мышцами 22 альфа (Transgelin, TAGLN2)

SMAD3 – белок семейства SMAD, участвующий в передаче сигнала TGF- β (Mothers against decapentaplegic homolog 3)

SMC – гладкомышечные клетки (Smooth muscle cells)

Sp1– транскрипционный фактор Sp1 (specificity factor 1)

TAGLN – трансгелин, маркер гладкомышечных клеток и миофибробластов (Transgelin)

TGF- β 1 – трансформирующий фактор роста-бета 1 (transforming growth factor beta 1)

VCAM-1 – васкулярная молекула клеточной адгезии 1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1)

VE-cad – кадгерин сосудистого эндотелия (VE-cadherin)

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor)

VIM – виментин, промежуточный филамент мезенхимальных клеток (Vimentin)

VWF – фактор фон Виллебранда (von Willebrand factor)

ZEB2, SNAI1, SNAI2, TWIST, Notch1, BMP2-7, TAGLN, SM22 α , EZH2– транскрипционные факторы и белки, участвующие в эпителиально-мезенхимальном переходе и регуляции дифференцировки клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. EMT and EndMT: Emerging Roles in Age-Related Macular Degeneration / Shu D.Y., Butcher E., Saint-Geniez M. [et al.]. – Text : visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21, – P. 4271.
2. Endothelial to mesenchymal transition in cardiovascular diseases: molecular insights and clinical perspectives / Hall I.F., Aikawa E., Sluimer J. [et al.]. – Text : visual // European Heart Journal. – 2026. – Vol. 47, – P. 1144–1158.
3. Broadening horizons: molecular mechanisms and disease implications of endothelial-to-mesenchymal transition / Qian C., Dong G., Yang C., [et al.]. – Text : visual // Cell Communication and Signaling. – 2025. – Vol. 23, – P. 16.
4. Research progress of endothelial-mesenchymal transition in diabetic kidney disease / Chen Y., Zou H., Lu H., [et al.]. – Text : visual // Journal of Cellular and Molecular Medicine. – 2022. – Vol. 26, – P. 3313–3322.
5. Endothelial-to-mesenchymal transition: advances and controversies / Simons M. [et al.] – Text visual // Current Opinion in Physiology. – 2023. – Vol. 34. – P. 100678.
6. GTF2H4 regulates partial EndMT via NF- κ B activation through NCOA3 phosphorylation in ischemic diseases / Fang Z., Zhao G., Zhao S., [et al.] – Text visual // The Innovation. – 2024. – Vol. 5, P.
7. N6-methyladenosine modification of KLF2 may contribute to endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension / Kang K., Xiang J., Zhang X., [et al.]. – Text : visual // Cellular & Molecular Biology Letters. – 2024. – Vol. 29, – P. 69.
8. The SETD8/ELK1/bach1 complex regulates hyperglycaemia-mediated EndMT in diabetic nephropathy Li X., Lu L., Hou W., [et al.]. – Text : visual // Journal of Translational Medicine. – 2022. – Vol. 20, – P. 147.
9. Knockdown of eIF3a alleviates pulmonary arterial hypertension by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition via TGF β 1/SMAD pathway / Jiao Q., Xu X., Xu L., [et al.]. – Text : visual // Journal of Translational Medicine. – 2025. – Vol. 23, – P. 524.

10. Li X. et al. The Transcription Factor TWIST-Related Protein 1 in Atherosclerosis/ Li, X., Zhang, C., Wu, D., [et al.]. – Text : visual // iNew Medicine. – 2025. – Vol. 1, – P. e70002.
11. BMPR1A promotes ID2–ZEB1 interaction to suppress excessive endothelial to mesenchymal transition/ Lee, H. W., Adachi, T., Pak, B. [et al.]. – Text : visual // Cardiovascular Research. – 2023. – Vol. 119. – P. 813-825.
12. Nitric Oxide: A Novel Mediator of Inflammation / Clancy, R. M., Abramson, S. B. [et al.]. – Text : visual // Proceedings of the Society for experimental Biology and Medicine. – 1995. – Vol. 210. – P. 93-101.
13. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? Singh S., Evans T. W. [et al.]. – Text : visual // European Respiratory Journal. – 1997. – Vol. 10. – P. 699-707.
14. Nitric oxide drives skin repair: Novel functions of an established mediator / Frank S., Kämpfer H., Wetzler C., [et al.]. – Text : visual // Kidney International. – 2002. – Vol. 61, – P. 882–888.
15. Nitric oxide in cellular adaptation and disease / Gantner B. N., LaFond K. M., Bonini M. G. [et al.]. – Text : visual // Redox Biology. – 2020. – Vol. 34, – P. 101550.
16. Nitric oxide-dependent mechanism of endothelial dysfunction formation is a promising target link for pharmacological management / Belenichev I.F., Bak P.G., Popazova O.O., [et al.]. – Text : visual // Biopolymers and Cell. – 2022. – Vol. 38, – P. 145–157.
17. Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses / Groß F., Durner J., Gaupels F. [et al.]. – Text : visual // Frontiers in plant science. – 2013. – Vol. 4. – P. 419.
18. Nitrosative Stress and Transcription / Kröncke K.-D. [et al.]. – Text : visual // Biological Chemistry. – 2003. – Vol. 384, – P. 1365.
19. An Apoptotic Model for Nitrosative Stress / Eu J.P., Liu L., Zeng M., [et al.]. – Text : visual // Biochemistry. – 2000. – Vol. 39, – P. 1040–1047.

20. Nitrosative stress in Parkinson's disease / Stykel M. G., Ryan S. D. [et al.]. – Text : visual // npj Parkinson's Disease. – 2022. – Vol. 8, – P. 104.
21. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems / Radi R., Peluffo G., Alvarez M.N., [et al.]. – Text : visual // Free Radical Biology and Medicine. – 2001. – Vol. 30, – P. 463–488.
22. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics Szabó C., Ischiropoulos H., Radi R. [et al.]. – Text : visual // Nature reviews Drug discovery. – 2007. – Vol. 6. – №. 8. – P. 662-680.
23. The nitration of proteins, lipids and DNA by peroxynitrite derivatives-chemistry involved and biological relevance/ Pérez de la Lastra, J. M., Juan, C. A., Plou, [et al.]. – Text : visual // Stresses. – 2022. – T. 2, – C. 53-64.
24. The superoxide radical switch in the biology of nitric oxide and peroxynitrite / Piacenza, L., Zeida, A., Trujillo, M., [et al.]. – Text : visual // Physiological reviews. – 2022. Vol. 102, P.4.
25. Superoxide, nitric oxide and peroxynitrite production by macrophages under different physiological oxygen tensions / Casella A.C., Prolo C., Pereyra J., [et al.]. – Text : visual // Free Radical Biology and Medicine. – 2024. – Vol. 212. – P. 330–335.
26. Selective peroxynitrite-mediated protein nitration catalyzed by glyoxalase domain containing protein 4 / Wright, S., Dang, V. C., Hussain, S., [et al.]. – Text : visual // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2026. – Vol. 123,– P. e2515002123.
27. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes / Augustin H. G., Kozian D. H., Johnson R. C. [et al.]. – Text : visual // Bioessays. – 1994. – T. 16. – P. 901-906.
28. Endothelial Cell Phenotype, a Major Determinant of Venous Thrombo-Inflammation / Pilard M., Ollivier E.L., Gourdou-Latyszenok V., [et al.]. – Text : visual // Frontiers in Cardiovascular Medicine. – 2022. – Vol. 9, - P. 864735.

29. Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Cardiovascular Pathophysiology / Singh A., Bhatt K.S., Nguyen H.C., [et al.]. – Text : visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25, – P. 6180.
30. S-Nitrosoglutathione Is Not a Substrate of OATP1B1, but Stimulates Its Expression and Activity / Abalenikhina, Y. V., Shchulkin, A. V., Suchkova, O. N., [et al.]. – Text : visual // Biomolecules. – 2025. – Vol. 15. – P. 428.
31. Изучение содержания p-, e-селектинов и гликопротеинового лиганда psgl-1 у пациентов с атеросклерозом артерий нижних конечностей / Короткова, Н. В., Калинин, Р. Е., Сучков, [и др.]. – Текст : непосредственный // Молекулярная медицина. – 2022. – Vol. 20, – P. 39-45.
32. Tissue affinity, a means of embryonic morphogenesis / Holtfreter J. [et al.]. – Text : visual // Arch. Exp. Zellforsch. – 1939. – Vol. 23. —P. 169–209.
33. Молекулярные и клеточные аспекты эндотелиально-мезенхимального перехода при сердечно-сосудистых заболеваниях / Стрельникова, Е. А., Калинин, Р. Е., Сучков, И. А., [и др.]. – Текст : непосредственный // Молекулярная биология. – 2023. – Т. 57, № 4. – С. 563–572.
34. Ginsenoside Rg3 protects against iE-DAP-induced endothelial-to-mesenchymal transition by regulating the miR-139-5p-NF- κ B axis / Lee A., Yun E., Chang W., [et al.]. – Text : visual // Journal of Ginseng Research. – 2020. – Vol. 44, – P. 300–307.
35. Endothelial-mesenchymal transition in atherosclerosis / Souilhol C., Harmsen M.C., Evans P.C., [et al.]. – Text : visual // Cardiovascular Research. – 2018. – Vol. 114. – P. 565–577.
36. Endothelial-mesenchymal transition as a novel mechanism for generating myofibroblasts during diabetic nephropathy / Kizu A., Medici D., Kalluri R. [et al.]. – Text : visual // The American Journal of Pathology. – 2009. – Vol. 175. – P. 1371–1373.
37. Snail is required for TGF β -induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells / Kokudo, T., Suzuki, Y., Yoshimatsu, Y. [et al.]. – Text : visual // Journal of Cell Science. – 2008. – Vol. 121. – P. 3317-3324.

38. Shear stress affects the intracellular distribution of eNOS: direct demonstration by a novel in vivo technique / Cheng C., Haperen R. van, Waard M. de, [et al.]. – Text : visual // *Blood*. – 2005. – Vol. 106, – P. 3691–3698*.

39. Mechanosensitive Notch-Dll4 and Klf2-Wnt9 signaling pathways intersect in guiding valvulogenesis in zebrafish / Paolini A., Fontana F., Pham V.- [et al.]. – Text : visual // *Cell Reports*. – 2021. – Vol. 37, – P. 109782.

40. Disturbed Flow Induces Atherosclerosis by Annexin A2-Mediated Integrin Activation / Demos C., Williams D., Jo H., [et al.]. – Text : visual // *Circulation Research*. – 2020. – Vol. 127, – P. 1091–1093.

41. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis / Mudau M., Genis A., Lochner A., Strijdom H., [et al.]. – Text : visual // *Cardiovascular Journal of Africa*. – 2012. – Vol. 23, – P. 222–231.

42. Regulatory role of mitochondria in oxidative stress and atherosclerosis / Chang J.-C., Kou S.-J., Lin W.-T., [et al.]. – Text : visual // *World Journal of Cardiology*. – 2010. – Vol. 2, – P. 150–159.

43. Ma Inflammatory Stress Exacerbates the Progression of Cardiac Fibrosis in High-Fat-Fed Apolipoprotein E Knockout Mice via Endothelial-Mesenchymal Transition / Ma, K. L., Liu, J., Ni, J., [et al.]. – Text : visual // *International Journal of Medical Sciences*. – 2013. – Vol. 10, – P. 420.

44. IL-1 β and TGF β 2 synergistically induce endothelial to mesenchymal transition in an NF κ B-dependent manner / Maleszewska M., Moonen J.-R.A.J., Huijkman N., [et al.]. – Text : visual // *Immunobiology*. – 2013. – Vol. 218, – P. 443–454.

45. Role of extracellular matrix proteins in heart function / Pelouch V., Dixon I.M., Golfman L., [et al.]. – Text : visual // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 1993. – Vol. 129, – P. 101–120.

46. Endothelial-to-mesenchymal transition: Cytokine-mediated pathways that determine endothelial fibrosis under inflammatory conditions / Pérez L., Muñoz-Durango N., Riedel C.A., [et al.]. – Text : visual // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. – 2017. – Vol. 33, – P. 41–54.

47. Stretch-induced paracrine hypertrophic stimuli increase TGF- β 1 expression in cardiomyocytes / Wamel A.J.E.T. van, Ruwhof C., Valk-Kokshoorn L.J.M. [et al.]. – Text : visual // Molecular and Cellular Biochemistry. – 2002. – Vol. 236, – P. 147–153.
48. Al Hattab D. A primer on current progress in cardiac fibrosis / Al Hattab D., Czubryt M.P. [et al.]. – Text : visual // Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 2017. – T. 95. – №. 10. – C. 1091-1099.
49. Fibrosis a lethal component of systemic sclerosis / Ho Y.Y., Lagares D., Tager A.M., [et al.]. – Text : visual // Nature Reviews. Rheumatology. – 2014. – Vol. 10, – P. 390–402.
50. Endothelial to Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease: JACC State-of-the-Art Review / Kovacic J.C., Dimmeler S., Harvey R.P., [et al.]. – Text : visual // Journal of the American College of Cardiology. – 2019. – Vol. 73, – P. 190–209.
51. Gremlin-1 is a key regulator of endothelial-to-mesenchymal transition in human pulmonary artery endothelial cells / Zhang, Y., Zhang, M., Xie, W., [et al.]. – Text : visual // Experimental Cell Research. 2020. – Vol. 390. – №. 1. – P. 111941.
52. Atomic Level Dissection of the Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1) Homophilic Binding Interface: Implications for Endothelial Cell Barrier Function / Liao D., Sundlov J., Zhu J., [et al.]. – Text : visual // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2022. – Vol. 42, – P. 193–204.
53. Sadler J.E. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor / Sadler J.E., [et al.]. – Text : visual // Annual Review of Biochemistry. – 1998. – Vol. 67, – P. 395–424.
54. VE-cadherin in vascular development: a coordinator of cell signaling and tissue morphogenesis / Legendijk A.K., Hogan B.M. [et al.]. – Text : visual // Current Topics in Developmental Biology. – 2015. – Vol. 112. – P. 325–352.
55. Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability / Corada M., Liao F., Lindgren M., [et al.]. – Text : visual // Blood. – 2001. – Vol. 97, – P. 1679–1684.

56. Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: From structure to assembly to gene ablation / Herrmann, H., Hesse, M., Reichenzeller, M., [et al.]. – Text : visual // International Review of Cytology. – 2002. – Vol. 223. – P. 83-175.
57. Williams C.M. Fibronectin Expression Modulates Mammary Epithelial Cell Proliferation during Acinar Differentiation / Williams C.M., Engler A.J., Slone R.D., [et al.]. – Text : visual // Cancer Research. – 2008. – Vol. 68, – P. 3185–3192.
58. Tissue distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in obese mice / Samad F., Loskutoff D.J. [et al.]. – Text : visual // Molecular Medicine. – 1996. – Vol. 2, – P. 568–582.
59. PAI-1 and atherothrombosis / Vaughan D.E. [et al.]. – Text : visual // Journal of thrombosis and haemostasis: JTH. – 2005. – Vol. 3, № 8. – P. 1879–1883.
60. PAI-1 Regulation of TGF- β 1-induced Alveolar Type II Cell Senescence, SASP Secretion, and SASP-mediated Activation of Alveolar Macrophages / Rana, T., Jiang, C., Liu, G., [et al.]. – Text : visual // American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. – 2020. – Vol. 62. – №. 3. – P. 319-330.
61. Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor / Fukudome K., Esmon C.T. [et al.]. – Text : visual // The Journal of Biological Chemistry. – 1994. – Vol. 269, № 42. – P. 26486–26491.
62. TGFbeta family signaling: novel insights in development and disease / Wharton K., Derynck R. [et al.]. – Text : visual // Development. – 2009. – Vol. 136, № 22. – P. 3691–3697.
63. Derynck Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling / Derynck, R., & Budi, E. H. [et al.]. – Text : visual // Science Signaling. – 2019. – Vol. 12. – №. 570. – P. eaav5183.
64. Isoform-specific effects of transforming growth factor β on endothelial-to-mesenchymal transition / Sabbineni H., Verma A., Somanath P.R., [et al.]. – Text : visual // Journal of Cellular Physiology. – 2018. – Vol. 233, № 11. – P. 8418–8428.
65. Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells / Medici D., Shore E.M., Lounev V.Y., [et al.]. – Text : visual // Nature Medicine. – 2010. – Vol. 16, № 12. – P. 1400–1406.

66. Transforming growth factor- β 2 promotes Snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling / Medici D., Potenta S., Kalluri R., [et al.]. – Text : visual // The Biochemical Journal. – 2011. – Vol. 437, № 3. – P. 515–520.

67. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology / Morikawa M., Derynck R., Miyazono K., [et al.]. – Text : visual // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. – 2016. – Vol. 8, № 5. – P. a021873.

68. TGF- β -Induced Endothelial to Mesenchymal Transition in Disease and Tissue Engineering / Ma J., Sanchez-Duffhues G., Goumans M.-J., [et al.]. – Text : visual // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2020. – T Vol 8. – P. 260.

69. Acetate controls endothelial-to-mesenchymal transition / Zhu X., Wang Y., Soaita I., [et al.]. – Text : visual // Cell Metabolism. – 2023. – Vol. 35, № 7. – P. 1163–1178.e10.

70. Massagué J. TGF β signalling in context / Massagué J. [et al.]. – Text : visual // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2012. – Vol. 13, № 10. – P. 616–630.

71. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism / Kopan R., Ilagan M.X.G. [et al.]. – Text : visual // Cell. – 2009. – Vol. 137, № 2. – P. 216–233.

72. Endothelial-to-Mesenchymal Transition: Role in Cardiac Fibrosis / Cheng W., Li X., Liu D., [et al.]. – Text : visual // Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics. – 2021. – Vol. 26, № 1. – P. 3–11.

73. Histone modification of endothelial-mesenchymal transition in cardiovascular diseases / Jun, Q., Youhong, L., Yuan, Z., [et al.]. – Text : visual // Frontiers in Cardiovascular Medicine. – 2022. – Vol. 9. – P. 1022988.

74. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition / Gonzalez D.M., Medici D. [et al.]. – Text : visual // Science signaling. – 2014. – Vol. 7, № 344. – P. re8.

75. Endothelial to Mesenchymal Transition: Role in Physiology and in the Pathogenesis of Human Diseases / Piera-Velazquez S., Jimenez S.A. [et al.]. – Text : visual // Physiological Reviews. – 2019. – T Vol 99, № 2. – P. 1281–1324.

76. Heterogeneous susceptibility of valve endothelial cells to mesenchymal transformation in response to $\text{TNF}\alpha$ / Farrar E.J., Butcher J.T. [et al.]. – Text : visual // *Annals of Biomedical Engineering*. – 2014. – Vol. 42, № 1. – P. 149–161.

77. Interleukin-1 induces major phenotypic changes in human skin microvascular endothelial cells / Romero L.I., Zhang D.N., Herron G.S., [et al.]. – Text : visual // *Journal of Cellular Physiology*. – 1997. – Vol. 173, № 1. – P. 84–92.

78. Enhancer of zeste homolog-2 (EZH2) methyltransferase regulates transgelin/smooth muscle-22 α expression in endothelial cells in response to interleukin-1 β and transforming growth factor- β 2 / Maleszewska, M., Gjaltema, R. A., Krenning, G., [et al.]. – Text : visual // *Cellular Signalling*. – 2015. – Vol. 27. – №. 8. – P. 1589-1596.

79. Endothelial to Mesenchymal Transition Represents a Key Link in the Interaction between Inflammation and Endothelial Dysfunction / Cho J.G., Lee A., Chang W., [et al.]. – Text : visual // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 294.

80. Endothelial to Mesenchymal Transition Contributes to Endothelial Dysfunction in Pulmonary Arterial Hypertension / Good R.B., Gilbane A.J., Trinder S.L., [et al.]. – Text : visual // *The American Journal of Pathology*. – 2015. – Vol. 185, № 7. – P. 1850–1858.

81. Endothelial mesenchymal transformation mediated by IL-1 β -induced FGF-2 in corneal endothelial cells / Lee J.G., Ko M.K., Kay E.P. [et al.]. – Text : visual // *Experimental Eye Research*. – 2012. – Vol. 95, № 1. – P. 35.

82. The molecular basis of endothelial cell plasticity / Dejana E., Hirschi K.K., Simons M. [et al.]. – Text : visual // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – P. 14361.

83. Pharmacological inhibition of β -catenin prevents EndMT in vitro and vascular remodeling in vivo resulting from endothelial Akt1 suppression / Sabbineni H., Verma A., Artham S., [et al.]. – Text : visual // *Biochemical Pharmacology*. – 2019. – Vol. 164. – P. 205–215.

84. EndMT Regulation by Small RNAs in Diabetes-Associated Fibrotic Conditions: Potential Link With Oxidative Stress / Giordo R., Ahmed Y.M.A., Allam

H., [et al.]. – Text : visual // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – Vol. 9. – P. 683594.

85. NOD2 promotes endothelial-to-mesenchymal transition of glomerular endothelial cells via MEK/ERK signaling pathway in diabetic nephropathy / Shang J., Zhang Y., Jiang Y., [et al.]. – Text : visual // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2017. – Vol. 484, № 2. – P. 435–441.

86. Serum response factor induces endothelial-mesenchymal transition in glomerular endothelial cells to aggravate proteinuria in diabetic nephropathy / Zhao L., Zhao J., Wang X., [et al.]. – Text : visual // *Physiological Genomics*. – 2016. – Vol. 48, № 10. – P. 711–718.

87. Lovastatin Alleviates Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Glomeruli via Suppression of Oxidative Stress and TGF- β 1 Signaling / Ma Z., Zhu L., Liu Y., [et al.]. – Text : visual // *Frontiers in Pharmacology*. – 2017. – Vol. 8.

88. Lactate promotes endothelial-to-mesenchymal transition via Snail1 lactylation after myocardial infarction / Fan M., Yang K., Wang X., [et al.]. – Text : visual // *Science Advances*. – 2023. – Vol. 9, № 5. – P. eadc9465.

89. FGF regulates TGF- β signaling and endothelial-to-mesenchymal transition via control of let-7 miRNA expression / Chen P.-Y., Qin L., Barnes C., [et al.]. – Text : visual // *Cell Reports*. – 2012. – Vol. 2, № 6. – P. 1684–1696.

90. Endocardial fibroelastosis is caused by aberrant endothelial to mesenchymal transition / Xu X., Friehs I., Zhong Hu T., [et al.]. – Text : visual // *Circulation Research*. – 2015. – Vol. 116, № 5. – P. 857–866.

91. Linagliptin-mediated DPP-4 inhibition ameliorates kidney fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition in a therapeutic regimen / Kanasaki K., Shi S., Kanasaki M., [et al.]. – Text : visual // *Diabetes*. – 2014. – Vol. 63, № 6. – P. 2120–2131.

92. Rapamycin prevents endothelial cell migration by inhibiting the endothelial-to-mesenchymal transition and matrix metalloproteinase-2 and -9: an in vitro study / Gao H., Zhang J., Liu T., [et al.]. – Text : visual // *Molecular Vision*. – 2011. – Vol. 17. – P. 3406–3414.

93. Cipriani P. The Endothelial-mesenchymal Transition in Systemic Sclerosis Is Induced by Endothelin-1 and Transforming Growth Factor- β and May Be Blocked by Macitentan, a Dual Endothelin-1 Receptor Antagonist / Cipriani P., Di Benedetto P., Ruscitti P., [et al.]. – Text : visual // The Journal of Rheumatology. – 2015. – Vol. 42, № 10. – P. 1808–1816.

94. Kallistatin inhibits TGF- β -induced endothelial-mesenchymal transition by differential regulation of microRNA-21 and eNOS expression / Guo Y., Li P., Bledsoe G., [et al.]. – Text : visual // Experimental Cell Research. – 2015. – Vol. 337, № 1. – P. 103–110.

95. Protective Effect of Spironolactone on Endothelial-to-Mesenchymal Transition in HUVECs via Notch Pathway / Chen X., Cai J., Zhou X., [et al.]. – Text : visual // Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology. – 2015. – Vol. 36, № 1. – P. 191–200.

96. Losartan inhibits endothelial-to-mesenchymal transformation in mitral valve endothelial cells by blocking transforming growth factor- β -induced phosphorylation of ERK / Wylie-Sears J., Levine R.A., Bischoff J. [et al.]. – Text : visual // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2014. – Vol. 446, № 4. – P. 870–875.

97. Experimental Models to Study Endothelial to Mesenchymal Transition in Myocardial Fibrosis and Cardiovascular Diseases / Mimouni M., Lajoix A.-D., Desmetz C. [et al.]. – Text : visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 25, № 1. – P. 382.

98. Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Health and Disease: Molecular Insights and Therapeutic Implications / Kim R., Chang W. [et al.]. – Text : visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – T Vol 26, № 23. – P. 11724.100.

99. Computational Model of the Endothelial to Mesenchymal Transition / Weinstein, N., Mendoza, L., & Álvarez-Buylla, E. R. [et al.]. – Text : visual // Frontiers in Genetics. – 2020. – Vol. 11. – P. 40.

100. TGF- β -Induced Endothelial to Mesenchymal Transition Is Determined by a Balance Between SNAIL and ID Factors / Ma J., Zon G. van der, Gonçalves M.A.F.V.,

[et al.]. – Text : visual // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – Vol. 9. – P. 616610.

101. Endothelial Cells Tissue-Specific Origins Affects Their Responsiveness to TGF- β 2 during Endothelial-to-Mesenchymal Transition / Ferreira, F. U., Souza, L. E. B., Thomé, C. H., [et al.]. – Text : visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20, № 3. – P. 458.

102. Molecular basis of cardiac endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT): differential expression of microRNAs during EndMT / Ghosh A.K., Nagpal V., Covington J.W., [et al.]. – Text : visual // *Cellular Signalling*. – 2012. – Vol. 24, № 5. – P. 1031–1036.

103. Role of endothelial-to-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 in transplant kidney interstitial fibrosis / Wang Z., Han Z., Tao J., [et al.]. – Text : visual // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2017. – Vol. 21, № 10. – P. 2359–2369.

104. Steinberg S.F. Oxidative stress and sarcomeric proteins / Steinberg S.F. [et al.]. – Text : visual // *Circulation Research*. – 2013. – T. 112, № 2. – C. 393–405.

105. Fundamental Mechanisms of the Cell Death Caused by Nitrosative Stress / Wang F., Yuan Q., Chen F., [et al.]. – Text : visual // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – Vol. 9. – P. 742483.

106. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness / Maes M., Galecki P., Chang Y.S., [et al.]. – Text : visual // *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. – 2011. – Vol. 35, № 3. – P. 676–692.

107. Reductive Stress in Inflammation-Associated Diseases and the Pro-Oxidant Effect of Antioxidant Agents / Pérez-Torres I., Guarner-Lans V., Rubio-Ruiz M.E. [et al.]. – Text : visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18, № 10. – P. 2098.

108. Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction / Schiattarella G.G., Altamirano F., Tong D., [et al.]. – Text : visual // *Nature*. – 2019. – Vol. 568, № 7752. – P. 351–356.

109. Gielis J.F. Oxidative and nitrosative stress during pulmonary ischemia-reperfusion injury: from the lab to the OR / Gielis J.F., Beckers P.A.J., Briedé J.J., [et al.]. – Text : visual // *Annals of Translational Medicine*. – 2017. – Vol. 5, № 6. – P. 131.

110. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism / Griffith O.W., Stuehr D.J. [et al.]. – Text : visual // *Annual Review of Physiology*. – 1995. – Vol. 57. – P. 707–736.

111. Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) and the Cardiovascular System: in Physiology and in Disease States / Tran N., Garcia T., Aniq M.[et al.]. – Text : visual // *American Journal of Biomedical Science & Research*. – 2022. – Vol. 15, № 2. – P. 153–177.

112. Nitric oxide in the nervous system: biochemical, developmental, and neurobiological aspects / Cossenza M., Socodato R., Portugal C.C., [et al.]. – Text : visual // *Vitamins and Hormones*. – 2014. – Vol. 96. – P. 79–125.

113. Nitric oxide mediated redox regulation of protein homeostasis / Tegeder I. [et al.]. – Text : visual // *Cellular Signalling*. – 2019. – Vol. 53. – P. 348–356.

114. Electrochemical Detection of NG-Hydroxy-L-arginine / Arral M.L., Halpern J.M. [et al.]. – Text : visual // *ECS Transactions*. – 2018. – Vol. 85, № 13. – P. 1163–1169.

115. Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity / Brutsaert D.L. [et al.]. – Text : visual // *Physiological Reviews*. – 2003. – Vol. 83, № 1. – P. 59–115.

116. Modulation of cGMP in heart failure: a new therapeutic paradigm / Boerrigter G., Lapp H., Burnett J.C. [et al.]. – Text : visual // *Handbook of Experimental Pharmacology*. – 2009. – № 191. – P. 485–506.

117. Nitric oxide signaling in health and disease / Lundberg J.O., Weitzberg E. [et al.]. – Text : visual // *Cell*. – 2022. – Vol. 185, № 16. – P. 2853–2878.

118. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide / Lundberg J.O., Govoni M. [et al.]. – Text : visual // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2004. – Vol. 37, № 3. – P. 395–400.

119. Peroxynitrite is the major species formed from different flux ratios of co-generated nitric oxide and superoxide: direct reaction with boronate-based fluorescent probe / Zielonka J., Sikora A., Joseph J., [et al.]. – Text : visual // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – Vol. 285, № 19. – P. 14210–14216.

120. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine / Furchgott R.F., Zawadzki J.V. [et al.]. – Text : visual // *Nature*. – 1980. – Vol. 288, № 5789. – P. 373–376.

121. Signal Transduction and the Gasotransmitters: NO, CO, and H₂S in Biology and Medicine / Wang, R. [et al.]. – Text : visual // Springer Science & Business Media, - 2004.

122. Astrocytic Oxidative/Nitrosative Stress Contributes to Parkinson's Disease Pathogenesis: The Dual Role of Reactive Astrocytes / Rizor A., Pajarillo E., Johnson J., [et al.]. – Text : visual // *Antioxidants*. – 2019. – Vol. 8, № 8. – P. 265.

123. Changes in Endothelial Nitric Oxide Production in Systemic Vessels during Early Ontogenesis-A Key Mechanism for the Perinatal Adaptation of the Circulatory System / Gaynullina D.K., Schubert R., Tarasova O.S. [et al.]. – Text : visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20, № 6. – P. 1421.

124. Glutathione and Nitric Oxide: Key Team Players in Use and Disuse of Skeletal Muscle / Baldelli S., Ciccarone F., Limongi D., [et al.]. – Text : visual // *Nutrients*. – 2019. – Vol. 11, № 10. – P. 2318.

125. A Review of the Pathophysiology and Novel Treatments for Erectile Dysfunction / Lasker G.F., Maley J.H., Kadowitz P.J. [et al.]. – Text : visual // *Advances in Pharmacological Sciences*. – 2010. – Vol. 2010. – P. 730861.

126. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury / Szabó C. [et al.]. – Text : visual // *Shock*. – 1996. – Vol. 6, № 2. – P. 79.

127. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease / Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. [et al.]. – Text : visual // *Physiological Reviews*. – 2007. – Vol. 87. – №. 1. – P. 315-424.

128. S-nitrosothiols as nitric oxide-donors: chemistry, biology and possible future therapeutic applications / Al-Sa'doni H.H., Ferro A. [et al.]. – Text : visual // *Current Medicinal Chemistry*. – 2004. – Vol. 11, № 20. – P. 2679–2690.

129. Nitrosative Stress and Human Disease: Therapeutic Potential of Denitrosylation / Yoon S., Eom G.H., Kang G. [et al.]. – Text : visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 18. – P. 9794.

130. Deciphering Nitric Oxide Stress in Bacteria with Quantitative Modeling / Robinson J.L., Adolfsen K.J., Brynildsen M.P. [et al.]. – Text : visual // *Current Opinion in Microbiology*. – 2014. – Vol. 0. – P. 16–24.

131. Redox Reactions Induced by Nitrosative Stress Mediate Protein Misfolding and Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases / Gu Z., Nakamura T., Lipton S.A. [et al.]. – Text : visual // *Molecular Neurobiology*. – 2010. – Vol. 41, № 0. – P. 55–72.

132. Nitrosative stress inhibits aminoacylation and editing activities of mitochondrial threonyl-tRNA synthetase by S-nitrosation / Zheng W.-Q., Zhang Y., Yao Q., [et al.]. – Text : visual // *Nucleic Acids Research*. – 2020. – Vol. 48, № 12. – P. 6799–6810.

133. S-nitrosoglutathione inhibits inducible nitric oxide synthase upregulation by redox posttranslational modification in experimental diabetic retinopathy / Rosales M.A.B., Silva K.C., Duarte D.A., [et al.]. – Text : visual // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2014. – Vol. 55, № 5. – P. 2921–2932.

134. Nitrosative stress by peroxynitrite impairs ATP production in human spermatozoa / Uribe P., Treulen F., Boguen R., [et al.]. – Text : visual // *Andrologia*. – 2017. – Vol. 49, № 3.

135. Establishment of primary cultures of human brain microvascular endothelial cells to provide an in vitro cellular model of the blood-brain barrier / Bernas, M. J., Cardoso, F. L., Daley, S. K., [et al.]. – Text : visual // *Nature Protocols* – 2010. – Vol. 5. – №. 7. – P. 1265-1272.

136. Human Primary Lung Endothelial Cells in Culture / Comhair S.A.A., Xu W., Mavrakakis L., [et al.]. – Text : visual // American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. – 2012. – Vol. 46, № 6. – P. 723–730.

137. Isolation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) / Crampton S.P., Davis J., Hughes C.C.W. [et al.]. – Text : visual // Journal of Visualized Experiments: JoVE. – 2007. – № 3. – P. 183.

138. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis / Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., [et al.]. – Text : visual // International journal of molecular sciences. – 2021. – Т. 22. – №. 23. – С. 12827.

139. Различные концентрации пероксинитрита вызывают уникальный клеточный ответ эндотелиоцитов *in vitro* / Короткова, Н. В., Калинин, Р. Е., Сучков, И. А., [и др.]. – Текст : непосредственный // Молекулярная медицина. – 2024. – Vol. 22. – №. 4. – P. 57-64.

140. Effect of Superoxide Dismutase Mimics on Radical Adduct Formation during the Reaction between Peroxynitrite and Thiols—An ESR-Spin Trapping Study / Karoui H., Hogg N., Joseph J., [et al.]. – Text : visual // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1996. – Vol. 330, № 1. – P. 115–124.

141. The effect of peroxynitrite and tert-butyl hydroperoxide on thiol ligands of dinitrosyl iron complexes / Pugachenko, I. S., Nasybullina, E. I., Kosmachevskaya, O. V., [et al.]. – Text : visual // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2023. – Vol. 59. – №. 5. – P. 561-569.

142. What is the real physiological NO concentration *in vivo*? / Hall C.N., Garthwaite J. [et al.]. – Text : visual // Nitric Oxide. – 2009. – Vol. 21, № 2. – P. 92–103.

143. The Bradford method for protein quantitation / Kruger N. J. [et al.]. – Text : visual // The protein protocols handbook. – 2009. – P. 17-24.

144. Стрельникова Е. А. и др. Эндотелий *in vivo* и *in vitro*. Часть 1: гистогенез, структура, цитофизиология и ключевые маркеры / Стрельникова, Е. А., Трушкина, П. Ю., Суров, И. Ю., [и др.]. – Текст : непосредственный // Наука молодых—Eruditio Juvenium. – 2019. – Т. 7. – №. 3. – С. 450-465.

145. Мжаванадзе Н. Д. и др. Влияние пероксинитрита на показатели $\text{tg}\beta 1$ -индуцированного эндотелиально-мезенхимального перехода в первичных культурах эндотелиоцитов *in vitro* / Мжаванадзе, Н. Д., Стрельникова, Е. А., Калинин, Р. Е., [и др.]. – Текст : непосредственный // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2026. – Т. 29. – №. 1. – С. 109-118.

146. Peroxynitrite induces HMGB1 release by cardiac cells *in vitro* and HMGB1 upregulation in the infarcted myocardium *in vivo* / Loukili, N., Rosenblatt-Velin, N., Li, J., [et al.]. – Text : visual // Cardiovascular Research. – 2011. – Vol. 89. – №. 3. – P. 586-594.

147. Hydrogen Peroxide Formation by Reaction of Peroxynitrite with HEPES and Related Tertiary Amines / Kirsch, M., Lomonosova, E. E., Korth, H. G., [et al.]. – Text : visual // Journal of Biological Chemistry. – 1998. – Vol. 273. – №. 21. – P. 12716-12724.

148. Peroxynitrite-mediated inactivation of heme oxygenases / Kinobe, R., Ji, Y., Nakatsu, K. [et al.]. – Text : visual // BMC Pharmacology. – 2004. – Vol. 4. – №. 1. – P. 26.

149. Двойственная роль пероксинитрита в организме / Стародубцева М.Н. [и др.]. – Текст : непосредственный // Проблемы здоровья и экологии. – 2004. – № 1. – С. 35–41.

150. Индуцибельная NO-синтаза как фармакологическая мишень противовоспалительной терапии: надежда не потеряна? / Галагудза, М. М., Бельский, Ю. П., Бельская, Н. В. [и др.]. – Текст : непосредственный // Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. – 2023. – Т. 38. – №. 1. – С. 13-20.

151. Модуляция активности различных синтаз оксида азота в качестве подхода к терапии эндотелиальной дисфункции / Куркин, Д. В., Абросимова, Е. Е., Бакулин, Д. А., [и др.]. – Текст : непосредственный // Фармация и фармакология. – 2022. – Т. 10. – №. 2. – С. 130-153.

152. Гребенчиков О. А. и др. Молекулярные механизмы окислительного стресса / Гребенчиков, О. А., Забелина, Т. С., Филипповская, Ж. С., [и др.]. –

Текст : непосредственный // Вестник интенсивной терапии имени АИ Салтанова. – 2016. – №. 3. – С. 13-21.

153. Соловьева А. Г. и др. Роль оксида азота в процессах свободнорадикального окисления / Соловьева, А. Г., Кузнецова, В. Л., Перетягин, С. П., [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2016. – № 1. – С. 228–233.

154. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration / Bartesaghi S., Radi R. [et al.]. – Text : visual // Redox Biology. – 2018. – Vol. 14. – P. 618–625.

155. Dityrosine formation outcompetes tyrosine nitration at low steady-state concentrations of peroxynitrite. Implications for tyrosine modification by nitric oxide/superoxide in vivo / Pfeiffer S., Schmidt K., Mayer B. [et al.]. – Text : visual // The Journal of Biological Chemistry. – 2000. – Vol. 275, № 9. – P. 6346–6352.

156. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration / Ferrer-Sueta G., Campolo N., Trujillo M., [et al.]. – Text : visual // Chemical Reviews. – 2018. – Vol. 118, № 3. – P. 1338–1408.

157. Endothelial-to-mesenchymal transition: pathogenesis and therapeutic targets for chronic pulmonary and vascular diseases / Lu X., Gong J., Dennerly P.A., [et al.]. – Text : visual // Biochemical Pharmacology. – 2019. – Vol. 168. – P. 100–107.

158. Histone modification of endothelial-mesenchymal transition in cardiovascular diseases / Jun, Q., Youhong, L., Yuan, Z., [et al.]. – Text : visual //Frontiers in Cardiovascular Medicine. – 2022. – Vol. 9. – P. 1022988.

159. Endothelial-to-mesenchymal transition in cardiovascular pathophysiology / Singh, A., Bhatt, K. S., Nguyen, H. C., [et al.]. – Text : visual //International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25. – №. 11. – P. 6180.

160. Endothelial-to-mesenchymal transition in tumour progression and its potential roles in tumour therapy / Yin Z., Wang L. [et al.]. – Text : visual // Annals of Medicine. – 2023. – T. 55, № 1. – С. 1058–1069.

161. Fibronectin matrix assembly at a glance / Sun, Y., Hamlin, A. J., Schwarzbauer, J. E. [et al.]. – Text : visual // *Journal of cell science*. – 2025. – Vol. 138. – №. 6. – P. jcs263834.

162. Vimentin: from a cytoskeletal protein to a critical modulator of immune response and a target for infection / Arrindell, J., Desnues, B. [et al.]. – Text : visual // *Frontiers in Immunology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1224352.

163. Peroxynitrite increases iNOS through NF-kappaB and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells / Cooke C.-L.M., Davidge S.T. [et al.]. – Text : visual // *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. – 2002. – Vol. 282, № 2. – P. C395–C402.

164. Peroxynitrite increases VEGF expression in vascular endothelial cells via STAT3 / Platt D.H., Bartoli M., El-Remessy A.B., [et al.]. – Text : visual // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2005. – Vol. 39, № 10. – P. 1353–1361.

165. Peroxynitrite Causes Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Human Vascular Endothelium / Dickhout, J. G., Hossain, G. S., Pozza, L. M., [et al.]. – Text : visual // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2005. – Vol. 25. – №. 12. – P. 2623-2629.

166. Arginase Inhibition Restores Peroxynitrite-Induced Endothelial Dysfunction via L-Arginine-Dependent Endothelial Nitric Oxide Synthase Phosphorylation / Nguyen M.C., Park J.T., Jeon Y.G., [et al.]. – Text : visual // *Yonsei Medical Journal*. – 2016. – Vol. 57, № 6. – P. 1329–1338.

167. Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways / Liaudet L., Vassalli G., Pacher P. [et al.]. – Text : visual // *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. – 2009. – Vol. 14. – P. 4809–4814.

168. Endothelial–Mesenchymal Transition and Possible Role of Cytokines in Streptozotocin-Induced Diabetic Heart / Kang H.L., Várkonyi Á., Csonka Á., [et al.]. – Text : visual // *Biomedicines*. – 2025. – Vol. 13, № 5. – P. 1148.170.

169. Pathophysiological role of peroxynitrite induced DNA damage in human diseases: a special focus on poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) / Islam, B. U.,

Habib, S., Ahmad, P., [et al.]. – Text : visual // Indian Journal of Clinical Biochemistry. – 2015. – Vol. 30. – №. 4. – P. 368-385.

170. Peroxynitrite induces destruction of the tetrahydrobiopterin and heme in endothelial nitric oxide synthase: transition from reversible to irreversible enzyme inhibition / Chen W., Druhan L.J., Chen C.-A., [et al.]. – Text : visual // Biochemistry – 2010. – Vol. 49 – № 14 – P.3129–3137.

171. A Potential Link Between Oxidative Stress and Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Systemic Sclerosis / Thuan D.T.B., Zayed H., Eid A.H., [et al.]. – Text : visual // Frontiers in Immunology – 2018. – Vol. 9.

172. Влияние пероксинитрита на показатели $\text{tg}\beta 1$ -индуцированного эндотелиально-мезенхимального перехода в первичных культурах эндотелиоцитов *in vitro*/ Мжаванадзе, Н. Д., Стрельникова, Е. А., Калинин, Р. Е., [и др.]. – Текст : непосредственный // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2026. – Т. 29. – №. 1. – С. 109-118.

173. Физиология и патология эндотелия / Табаров, М. С., Тоштемирова, З. М., Саидмурадова, Р. А., [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник Авиценны. – 2012. – №. 2 (51). – С. 196-202.

174. The epigenetic landscape: An evolving concept / Henikoff S. [et al.]. – Text : visual // Frontiers in Epigenetics and Epigenomics – 2023. – Vol. 1. – P. 1176449.

175. Haig D. The (Dual) Origin of Epigenetics / Haig D. [et al.]. – Text : visual // Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology – 2004. – Vol. 69 – P.67–70.