

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

### ПРОФИЛЬ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В ПРИСУТСТВИИ МИТОМИЦИНА С

*М.Ю. Синицкий\*, А.В. Цепкина, А.Г. Кутихин, Д.К. Шишкова, А.В. Понасенко*

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, 650002, Кемерово, Сосновый бульвар, 6; \*эл. почта: max-sinitsky@rambler.ru

Проведена оценка экспрессии генов репарации ДНК (*DDB1*, *ERCC4*, *ERCC5*), адгезии лейкоцитов (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SELP*), эндотелиальной механотрансдукции (*KLF4*), эндотелиальной дифференцировки (*PECAM1*, *CDH5*, *CD34*, *NOS3*), эндотелиально-мезенхимального перехода (*SNAIL*, *SNAI2*, *TWIST1*, *GATA4*, *ZEB1*, *CDH2*), скавенджер-рецепторов (*LOX1*, *SCARF1*, *CD36*, *LDLR*, *VLDLR*), антиоксидантной защиты (*PXDN*, *CAT*, *SOD1*) и транскрипционного фактора *HEY2* в культурах первичных эндотелиальных клеток коронарной (HCAEC) и внутренней грудной (HITAEC) артерий человека, экспонированных алкилирующим мутагеном митомицином С (MMC). Уровень экспрессии определяли с помощью метода количественной ПЦР в двух временных точках: через 6 ч культивирования клеток в присутствии MMC и через 6 ч экспозиции мутагеном с последующими 24 ч культивирования в чистой культуральной среде. Непосредственно после воздействия мутагена в экспонированных культурах HCAEC и HITAEC было отмечено снижение экспрессии практически всех изученных генов, за исключением *SNAI2* (его экспрессия была повышена в 4 раза) по сравнению с неэкспонированным контролем. После элиминирования из культур MMC в обеих клеточных линиях было отмечено увеличение экспрессии генов *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SNAI2*, *KLF4* и снижение экспрессии генов *PECAM1*, *CDH5*, *CD34*, *ZEB1*, *CAT*, *PXDN*. Кроме того, клетки HITAEC также характеризовались снижением экспрессии генов *SOD1*, *SCARF1*, *CD36* и повышением экспрессии генов *SNAIL* и *TWIST1*; в клетках HCAEC было отмечено увеличение экспрессии генов *LDLR* и *VLDLR*. Таким образом, генотоксический стресс, вызванный мутагеном алкилирующего механизма действия, ассоциирован с развитием эндотелиальной дисфункции, что проявляется в изменении профиля генной экспрессии эндотелиальных клеток, культивируемых в условиях генотоксической нагрузки.

**Ключевые слова:** мутагенез; атерогенез; эндотелиальная дисфункция; генная экспрессия

**DOI:** 10.18097/PBMC20216702130

## ВВЕДЕНИЕ

Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) занимают лидирующую позицию в структуре заболеваемости, как во всем мире, так и в России. При этом атеросклероз является наиболее распространенной патологией сердечно-сосудистой системы, приводящей к инвалидизации и смертности среди населения, в том числе и трудоспособного возраста [1]. Атеросклероз представляет собой комплексный воспалительный процесс, в который вовлечены различные клетки (эндотелиальные, гладкомышечные, лимфоциты и макрофаги), внеклеточные липиды, коллаген и др. Различные факторы роста и провоспалительные цитокины способствуют аккумуляции иммунных клеток и компонентов внеклеточного матрикса в стенке сосуда и образованию атеросклеротической бляшки. Начало патологического процесса связано с развитием эндотелиальной дисфункции, ассоциированной с различными факторами риска, такими как курение, диабет, гиперхолестеремия, а также наследственной предрасположенностью [2].

Несмотря на прогресс в понимании патогенеза атеросклероза, роль молекулярно-генетических механизмов атерогенеза на настоящий момент изучена недостаточно. Так, существуют данные о том, что в основе данной патологии, помимо классических

факторов риска, также лежит неопластический процесс и повреждение ДНК [3-7]. Установлено, что обработка эндотелиальных клеток мутагеном, вызывающим образование поперечных сшивок молекулы ДНК, приводит к значительному повышению уровня цитогенетических повреждений [8], ассоциированному с повышенной секрецией и экспрессией проатеросклеротических цитокинов [9, 10].

Целью данного исследования была оценка уровня экспрессии генов репарации ДНК (*DDB1*, *ERCC4*, *ERCC5*), адгезии лейкоцитов (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SELP*), эндотелиальной механотрансдукции (*KLF4*), эндотелиальной дифференцировки (*PECAM1*, *CDH5*, *CD34*, *NOS3*), эндотелиально-мезенхимального перехода (*SNAIL*, *SNAI2*, *TWIST1*, *GATA4*, *ZEB1*, *CDH2*), скавенджер-рецепторов (*LOX1*, *SCARF1*, *CD36*, *LDLR*, *VLDLR*), антиоксидантной защиты (*PXDN*, *CAT*, *SOD1*) и транскрипционного фактора *HEY2* в культурах первичных эндотелиальных клеток коронарной (HCAEC) и внутренней грудной (HITAEC) артерий человека, экспонированных алкилирующим мутагеном митомицином С (MMC).

## МЕТОДИКА

Исследование было выполнено на коммерческих культурах первичных эндотелиальных клеток коронарной (HCAEC) и внутренней грудной (HITAEC)

артерий человека (“Cell Applications Inc.”, США). Выбор данных клеточных линий был обусловлен различной чувствительностью коронарной и внутренней грудной артерий к атерогенезу (первая является наиболее часто поражаемой атеросклерозом, а во второй, наоборот, атеросклеротическое поражение отмечается крайне редко) [11].

Общий дизайн эксперимента представлен на рисунке 1. Клетки культивировали в стандартных условиях (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, повышенная влажность) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе Sanyo MCO-19AIC (“Sanyo”, Япония) в среде для роста клеток Human MesoEndo Cell Growth Medium (“Cell Applications Inc.”) до достижения 90% конfluэнтности. После четырёх пассажей, 2×10<sup>5</sup> клеток пересеивали в 6-луночные культуральные планшеты, в каждую лунку добавляли 2 мл культуральной среды и культивировали в стандартных условиях ещё 24 ч. На каждую клеточную линию готовили по четыре культуральных планшета. Далее удаляли старую среду для роста клеток и добавляли в каждую лунку двух планшетов с клетками каждой клеточной линии 2 мл свежей среды, содержащей в качестве модельного мутагена MMC (“AppliChem”, Испания) в концентрации 500 нг/мл (эксперимент). В оставшиеся планшеты приливали свежую среду, содержащую 0,9% раствор NaCl (контроль). После этого клетки культивировали в течение 6 ч в стандартных условиях. Концентрация MMC (500 нг/мл) и время культивирования в условиях генотоксической нагрузки (6 ч) были выбраны на основе имеющихся рекомендаций по моделированию мутагенеза *in vitro* [12, 13] и полученных нами ранее данных о цитотоксических и генотоксических эффектах в культурах эндотелиоцитов после их 6 ч экспозиции 500 нг/мл MMC [8]. После 6 ч культивирования

два контрольных и два экспериментальных планшета с клетками HCAEC и HITAEC выводили из эксперимента (точка 1); в оставшихся планшетах проводили замену культуральной среды на чистую и культивировали их ещё 24 ч (точка 2), после чего также выводили из эксперимента.

Перед началом следующего этапа эксперимента рабочая зона и используемое оборудование обрабатывались ингибитором РНКаз RNaseZap™ RNase Decontamination Solution (“Invitrogen”, США). Клетки, выведенные из эксперимента, двукратно отмывали холодным фосфатно-солевым буфером и лизировали в 1 мл реагента QIAzol® Lysis Reagent (“Qiagen”, Германия). Тотальную РНК выделяли из клеток с помощью коммерческого набора RNeasy® Plus Universal Mini Kit (“Qiagen”) в соответствии с протоколом производителя набора. Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop™ 2000 (“Thermo Scientific”, США), а её качество — на спектрофотометре Qubit 4 Fluorometer (“Invitrogen”) путём измерения RIQ (RNA Integrity and Quality) индекса с использованием набора реагентов Qubit RNA IQ Assay Kit (“Invitrogen”). Выделенную РНК хранили при температуре -80°C.

Используя коммерческие наборы High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (“Applied Biosystems”, США), на основе 100 нг выделенной РНК с помощью реакции обратной транскрипции синтезировали молекулу комплементарной ДНК. Её концентрацию и качество также определяли на спектрофотометре NanoDrop™ 2000 (“Thermo Scientific”). Синтезированную кДНК хранили при -20°C.

Оценку уровня экспрессии генов репарации ДНК (*DDB1*, *ERCC4*, *ERCC5*), адгезии лейкоцитов (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SELP*), эндотелиальной

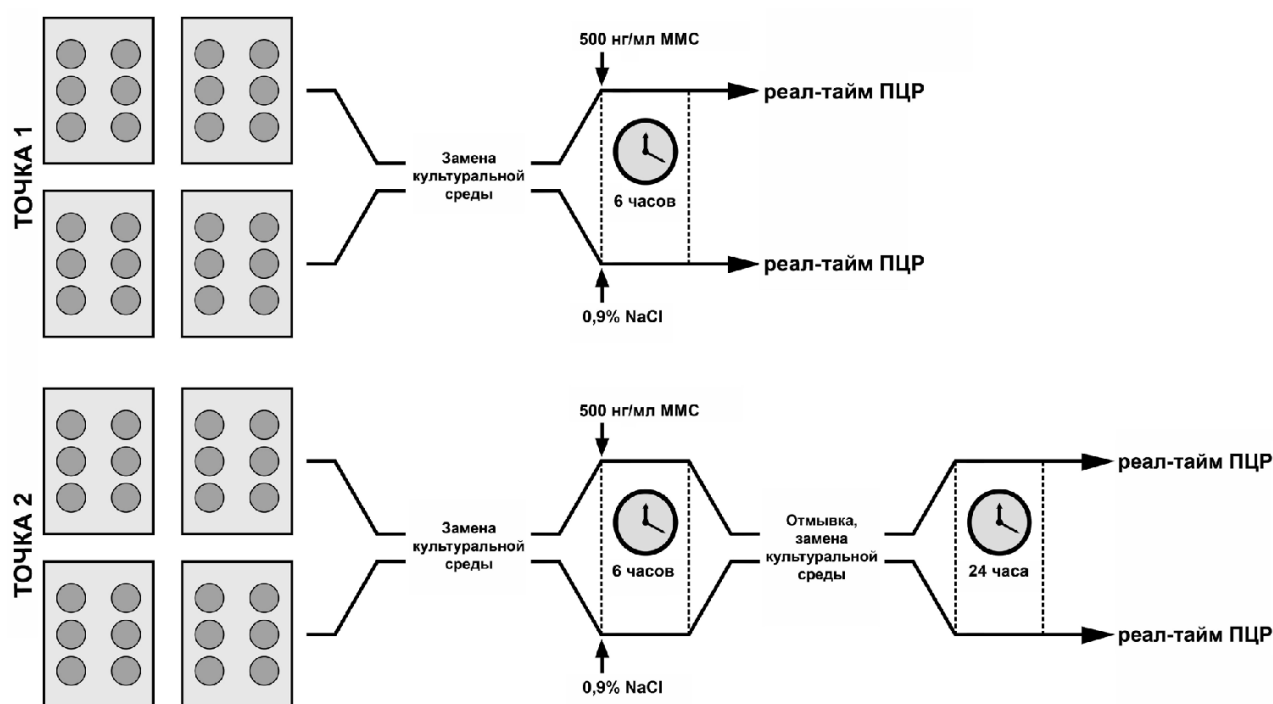


Рисунок 1. Дизайн эксперимента (MMC, митомицин С; ПЦР, полимеразная цепная реакция).

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ В ЭНДОТЕЛИОЦИТАХ, ОБРАБОТАННЫХ МУТАГЕНОМ

механотрансдукции (*KLF4*), эндотелиальной дифференцировки (*PECAM1*, *CDH5*, *CD34*, *NOS3*), эндотелиально-мезенхимального перехода (*SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, *GATA4*, *ZEB1*, *CDH2*), сквенджер-рецепторов (*LOX1*, *SCARF1*, *CD36*, *LDLR*, *VLDLR*), антиоксидантной защиты (*PXDN*, *CAT*, *SOD1*) и транскрипционного фактора *HEY2* проводили в точках 1 и 2 с помощью количественной полимеразной цепной реакции с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени (реал-тайм ПЦР) на амплификаторе ViiA7 (“Applied Biosystems”) с использованием зондов TaqMan™ Gene Expression Assay (“Applied Biosystems”) для генов *DDB1*, *ERCC4*, *ERCC5*, *CAT* и *SOD1* (табл. 1); для остальных генов — с использованием SYBR Green праймеров (“Евроген”, Россия) (табл. 2). ПЦР проводили в 96-луночном планшете, содержащем 26 анализируемых образцов, 5 стандартов с двукратным разведением и отрицательный контроль (реакционная смесь без кДНК). Каждый анализируемый образец, стандарт и отрицательный контроль анализировали в трёх технических повторях. Для генов *DDB1*, *ERCC4*, *ERCC5*, *CAT* и *SOD1* на каждый образец готовили 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мкл мастер-микса TaqMan™ Gene Expression Master Mix (“Applied Biosystems”), 1 мкл TaqMan™ Gene Expression Assay (“Applied Biosystems”) и 9 мкл кДНК в концентрации 50 нг/мкл. Амплификация осуществлялась по следующей программе: 2 мин при 50°C, 10 мин при 95°C, 40 циклов 15 с при 95°C и 60 с при 60°C. Для остальных генов общий объём реакционной смеси составлял 10 мкл и включал в себя 5 мкл мастер-микса PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (“Applied Biosystems”), 500 нМ прямого и обратного праймеров (“Евроген”) и 5 мкл кДНК в концентрации 10 нг/мкл. Амплификацию проводили по следующей программе: 2 мин при 50°C, 2 мин при 95°C, 40 циклов 15 с при 95°C и 60 с при 60°C. Результаты ПЦР нормировали с помощью среднего геометрического значения *Ct* трёх референсных генов *HPRT1*, *GAPDH* и *B2M* [14]. Уровень экспрессии изучаемых генов в клетках НСАЕС и НІТАЕС, культивируемых в условиях генотоксической нагрузки, рассчитывали по методу  $\Delta Ct$  и выражали в виде кратности изменения относительно неэкспонированного контроля. Статистическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism 8. Различия между группами считались статистически значимыми при значениях  $p < 0,05$  (U-критерий Манна-Уитни).

Таблица 1. Характеристика TaqMan зондов, использованных в эксперименте

Ген	Референсный номер	Длина ампликона
<i>B2M</i>	Hs00187842_m1	64
<i>CAT</i>	Hs00156308_m1	68
<i>DDB1</i>	Hs01096550_m1	75
<i>ERCC4</i>	Hs01063530_m1	64
<i>ERCC5</i>	Hs01557031_m1	71
<i>GAPDH</i>	Hs02758991_g1	93
<i>HPRT1</i>	Hs02800695_m1	82
<i>SOD1</i>	Hs00533490_m1	60

Таблица 2. Характеристика SYBR Green праймеров, использованных в эксперименте

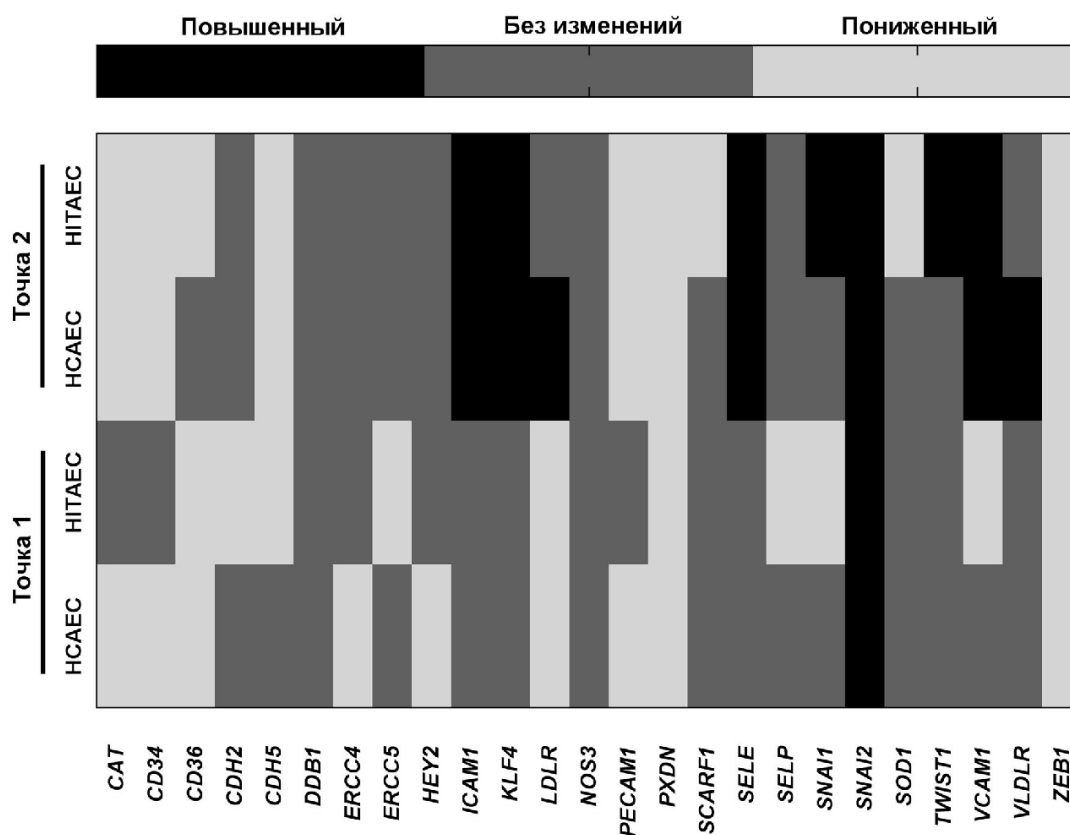
Ген	Последовательность
<i>B2M</i>	Прямой: 5'-TCCATCCGACATTGAAGTTG-3' Обратный: 5'-CGGCAGGCATACTCATCTT-3'
<i>CD34</i>	Прямой: 5'-GTCTTCCACTCGGTGCGTCT-3' Обратный: 5'-TGGGGTAGCAGTACCGTTGT-3'
<i>CD36</i>	Прямой: 5'-GGCTGTGACCGGAAGTGTG-3' Обратный: 5'-AGGTCTCCAAGTGGCATTAGAA-3'
<i>CDH2</i>	Прямой: 5'-GCTTCTGGTGAAATCGCATTA-3' Обратный: 5'-AGTCTCTCTTCTGCCTTTGTAG-3'
<i>CDH5</i>	Прямой: 5'-AAGCGTGAGTCGCAAGAATG-3' Обратный: 5'-TCTCCAGGTTTTCGCCAGTG-3'
<i>GAPDH</i>	Прямой: 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3' Обратный: 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
<i>GATA4</i>	Прямой: 5'-GAAAACGGAAGCCCAAGAACC-3' Обратный: 5'-AGACATCGCACTGACTGAGAACG-3'
<i>HEY2</i>	Прямой: 5'-ACCTCCGAGAGCGACATGGA-3' Обратный: 5'-CGATCCCAGCGCTTTTCTC-3'
<i>HPRT1</i>	Прямой: 5'-TTGCTTTCCTTGGTCAGGCA-3' Обратный: 5'-TCGTGGGGTCCTTTTACCA-3'
<i>ICAM1</i>	Прямой: 5'-TTGGGCATAGAGACCCCGTT-3' Обратный: 5'-GCACATTGCTCAGTTCATACACC-3'
<i>KLF4</i>	Прямой: 5'-GAAAAGGACCGCCACCCACA-3' Обратный: 5'-AGCGGGCGAATTTCCATCCA-3'
<i>LDLR</i>	Прямой: 5'-ACGGCGTCTCTTCTATGACA-3' Обратный: 5'-CCCTTGGTATCCGAACAGA-3'
<i>LOX1</i>	Прямой: 5'-TGAAGGACCAGCCTGATGAGAAGTC-3' Обратный: 5'-GAGCCCGAGGAAAATAGGTAACAG-3'
<i>NOS3</i>	Прямой: 5'-GTGATGGCGAAGCGAGTGAAG-3' Обратный: 5'-CCGAGCCCGAACACACAGAAC-3'
<i>PECAM1</i>	Прямой: 5'-AAGGAACAGGAGGGAGAGTATTA-3' Обратный: 5'-GTATTTTGCTTCTGGGGACACT-3'
<i>PXDN</i>	Прямой: 5'-AGCCAGCCATCACCTGGAAC-3' Обратный: 5'-TTCCGGGGCCACACACTCATA-3'
<i>SCARF1</i>	Прямой: 5'-CCGATCAGACCTCAAGGACAG-3' Обратный: 5'-CCCAGGGTAGCTTGTGGGA-3'
<i>SELE</i>	Прямой: 5'-ACCCTGGCTTCAGTGGACTC-3' Обратный: 5'-TGCTTGGCAGGTAACCCCTAT-3'
<i>SELP</i>	Прямой: 5'-ATGGGTGGGAACCAAAAAGG-3' Обратный: 5'-GGCTGACGGAAGTCTTGTATGAT-3'
<i>SNAI1</i>	Прямой: 5'-CAGACCCACTCAGATGTCAAGAA-3' Обратный: 5'-GGGCAGGTATGGAGAGGAAGA-3'
<i>SNAI2</i>	Прямой: 5'-ACTCCGAAGCCAAATGACAA-3' Обратный: 5'-CTCTCTCTGTGGGTGTGTGT-3'
<i>TWIST1</i>	Прямой: 5'-GTCCGCAGTCTTACGAGGAG-3' Обратный: 5'-GCTTGAGGGTCTGAATCTTGCT-3'
<i>VCAM1</i>	Прямой: 5'-CGTCTTGGTCAGCCCTTCCT-3' Обратный: 5'-ACATTCATATACTCCCGCATCCTTC-3'
<i>VLDLR</i>	Прямой: 5'-AGAAAAGCCAAATGTGAACCCT-3' Обратный: 5'-CACTGCCGTCAACACAGTCT-3'
<i>ZEB1</i>	Прямой: 5'-GATGATGAATGCGAGTCAGATGC-3' Обратный: 5'-ACAGCAGTGTCTTGTGTGTGT-3'

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведённого исследования все изученные гены были разделены на три группы по характеру изменения их экспрессии в клетках, экспонированных MMC в сравнении с неэкспонированным контролем: гены с повышенной экспрессией, гены с пониженной экспрессией и гены, экспрессия которых значимо не изменялась (рис. 2). Так, непосредственно после 6 ч культивирования клеток в присутствии мутагена (точка 1), наблюдалось снижение (либо отсутствие значимых изменений) уровня экспрессии изученных генов как в культурах HCAEC, так и HITAEC; исключение составил ген *SNAI2*, экспрессия которого в экспонированных культурах была выше, чем в контроле. После элиминирования из культур MMC (точка 2) отмечалось изменение профиля генной экспрессии эндотелиальных клеток, сопровождающееся повышением уровня экспрессии генов, регулирующих адгезию лейкоцитов к эндотелию (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*), эндотелиально-мезенхимальный переход (*SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*), генов скавенджер-рецепторов (*LDLR*, *VLDLR*) и эндотелиальной механотрансдукции (*KLF4*). Одновременно с этим в экспонированных клеточных культурах снижалась экспрессия генов эндотелиальной дифференцировки (*PECAM1*, *CDH5*, *CD34*), антиоксидантной защиты (*PXDN*, *CAT*, *SOD1*), эндотелиально-мезенхимального перехода (*ZEB1*)

и скавенджер-рецепторов (*SCARF1*, *CD36*). Также необходимо отметить, что характер экспрессии генов транскрипционных факторов, скавенджер-рецепторов и антиоксидантной системы различался между культурами HCAEC и HITAEC. Кроме того, в изученных клеточных культурах не удалось зарегистрировать экспрессию генов *LOX1* и *GATA4*, вероятно, из-за её слишком низкого уровня в изучаемых клетках.

MMC — это алкилирующий мутаген, который взаимодействует с ДНК в области CpG сайтов, что приводит к образованию поперечных сшивок молекулы ДНК, нарушению репликации и транскрипции и, в конечном итоге, к апоптозу [15]. MMC активно используется в экспериментах, связанных с индукцией генотоксического стресса *in vitro*, что обусловлено его хорошей растворимостью, стабильностью и способностью сохранять мутагенную активность при добавлении к клеточным культурам. Сходным с MMC механизмом действия на ДНК обладает целый ряд экзо- и эндогенных соединений, а также продуктов метаболизма, что позволяет использовать его в качестве модельного соединения при изучении молекулярно-генетических эффектов генотоксического стресса в различных клеточных культурах [16, 17]. Обнаруженное в эксперименте снижение экспрессии большинства изученных генов непосредственно после воздействия MMC может носить компенсаторный характер в ответ



**Рисунок 2.** Уровень генной экспрессии в экспонированных мутагеном клеточных культурах по сравнению с неэкспонированным контролем (HCAEC, эндотелиальные клетки коронарной артерии; HITAEC, эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии; точка 1 — 6 ч культивирования с митомицином C; точка 2 — 6 ч культивирования с митомицином C с последующими 24 ч культивированием в чистой культуральной среде).

на генотоксический стресс. Кроме того, ММС может воздействовать непосредственно на молекулу РНК (также содержащую CpG сайты вследствие своей конформационной структуры), что приводит к её деградации. Одновременно с этим повышение экспрессии гена *SNAI2*, контролирующего эндотелиально-мезенхимальный переход, может служить ранним маркером развития эндотелиальной дисфункции и атерогенеза в экспонированных клеточных культурах, что подтверждается результатами изучения профиля генной экспрессии в клетках после элиминирования из культур ММС и их культивирования ещё в течение суток (продолжительность одного митотического цикла эндотелиоцита). Так, нами было обнаружено, что в экспонированных ММС культурах наблюдается более активная экспрессия генов адгезии лейкоцитов к эндотелию, эндотелиально-мезенхимального перехода и скавенджер-рецепторов. Одними из главных маркеров развития эндотелиальной дисфункции являются усиление адгезии мононуклеарных фракций крови к плазматической мембране эндотелиоцитов [18] за счёт повышения экспрессии специализированных молекул клеточной адгезии и изменение функциональной активности скавенджер-рецепторов, также локализованных на поверхности эндотелиальных клеток и ответственных за распознавание и удаление модифицированных липопротеинов [19]. Все эти изменения запускают процесс воспаления, которое, в свою очередь, также является триггером атеросклеротического поражения сосуда. Ещё одним фактором сосудистого воспаления и образования атеросклеротических бляшек является эндотелиально-мезенхимальный переход, заключающийся в приобретении эндотелиальными клетками мезенхимального фенотипа, что сопровождается повышенной экспрессией эндотелиоцитами мезенхимальных маркеров и белков внеклеточного матрикса, потерей клеточных контактов, увеличением подвижности клеток и их миграции вглубь сосудистой стенки [20]. Недавно было также установлена атеропротективная роль гена *KLF4* [21]. Можно предположить, что компенсаторное повышение его экспрессии в нашем эксперименте связано с ответом на развитие эндотелиальной дисфункции. Таким образом, полученные нами данные об изменении профиля генной экспрессии эндотелиальных клеток в ответ на генотоксический стресс, индуцированный алкилирующим мутагеном ММС, свидетельствуют о развитии эндотелиальной дисфункции и формировании эндотелиальными клетками проатеросклеротического фенотипа [22, 23].

Необходимо также отметить, что клетки НСАЕС и НТАЕС характеризовались дифференциальным повышением экспрессии генов адгезии лейкоцитов к эндотелию, эндотелиально-мезенхимального перехода и скавенджер-рецепторов (табл. 3). Так, гены *VCAM1*, *SELE* и *KLF4* в клетках НСАЕС, культивируемых в условиях генотоксической нагрузки, экспрессировались в 4-5 раз активнее, чем в контроле, в то время как для клеток НТАЕС

Таблица 3. Кратность изменения дифференциально экспрессируемых генов в экспонированных митомизином С клетках по сравнению с контролем после элиминирования мутагена из культуры

Ген	НСАЕС	НТАЕС
<i>CAT</i>	0,6	0,5
<i>CD34</i>	0,2	0,2
<i>CD36</i>	0,9	0,6*
<i>CDH5</i>	0,5	0,6
<i>ICAM1</i>	2,2	2,0
<i>KLF4</i>	4,3	1,9*
<i>LDLR</i>	2,2	1,3*
<i>PECAM1</i>	0,4	0,5
<i>PXDN</i>	0,8	0,6
<i>SCARF1</i>	1,2	0,7
<i>SELE</i>	5,1	1,9*
<i>SNAI1</i>	0,8	1,5*
<i>SNAI2</i>	1,9	2,4
<i>SOD1</i>	0,8	0,5
<i>TWIST1</i>	1,1	3,0*
<i>VCAM1</i>	4,5	2,1*
<i>VLDLR</i>	2,4	0,8*
<i>ZEB1</i>	0,5	0,5

Примечание: \* — достоверные различия по сравнению с культурами НСАЕС (НСАЕС, эндотелиальные клетки коронарной артерии; НТАЕС, эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии).

было показано всего лишь двукратное изменение их экспрессии. Помимо этого, для клеток НТАЕС либо не было показано изменения экспрессии генов скавенджер-рецепторов (*LDLR*, *VLDLR*), либо, наоборот, их экспрессия снижалась (*SCARF1*, *CD36*), в то время как в клетках НСАЕС было отмечено двукратное увеличение уровня мРНК генов *LDLR* и *VLDLR*. Гены эндотелиально-мезенхимального перехода *SNAI1* и *TWIST1*, напротив, не изменяли свою экспрессию в культурах НСАЕС, но не в культурах НТАЕС (усиление экспрессии в 1,5 и 3 раза соответственно) (табл. 3). Данные результаты свидетельствуют о повышенной чувствительности клеток НСАЕС к генотоксическому воздействию, выражающейся в более активной экспрессии генов, задействованных в атерогенезе, что согласуется с литературными данными о более высокой подверженности коронарной артерии к атеросклеротическому поражению [24].

Обнаруженное в нашем эксперименте снижение экспрессии генов, кодирующих молекулы системы антиоксидантной защиты, в экспонированных клеточных культурах, может свидетельствовать об угнетении защитных функций эндотелиальных клеток и их повышенной чувствительности к действию активных форм кислорода, также вызывающих повреждение ДНК и провоцирующих развитие эндотелиальной дисфункции.

Повреждённый эндотелиальный монослой может регенерировать за счёт эндотелиальных прогениторных клеток, обладающих как фенотипом стволовых клеток, так и экспрессирующих маркеры эндотелиальной дифференцировки (например, CD34, VE-кадгерин, фактор фон Виллебранда) [25]. Таким образом, уменьшение уровня экспрессии генов эндотелиальной дифференцировки (*PECAM1*, *CDH5*, *CD34*) в ответ на действие ММС свидетельствует о снижении способности эндотелиальных клеток к регенерации и, следовательно, повышении риска развития эндотелиальной дисфункции в ответ на генотоксический стресс.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения исследования было установлено, что генотоксический стресс в эндотелиальных клетках, вызванный мутагеном алкилирующего механизма действия, приводит к изменению профиля генной экспрессии эндотелиоцитов, свидетельствующему о развитии эндотелиальной дисфункции и формировании клетками проатеросклеротического фенотипа. При этом клетки различных артерий характеризуются дифференциальной чувствительностью к действию ММС.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук МК-1228.2021.1.4.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не связана с исследованиями, в которых в качестве объекта выступают люди или животные, и выполнена на коммерчески доступных культурах первичных эндотелиальных клеток.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *GBD 2017* (2018) *Lancet*, **392**, 1736-1788.
2. *Libby P., Ridker P.M., Hansson G.K.* (2011) *Nature*, **473**, 317-325.
3. *Gray K., Bennett M.* (2011) *Biochem. Pharmacol.*, **82**, 693-700.
4. *Cervelli T., Borghini A., Galli A., Andreassi M.G.* (2012) *Int. J. Mol. Sci.*, **13**, 16929-16944.

5. *Borghini A., Cervelli T., Galli A., Andreassi M.G.* (2013) *Atherosclerosis*, **230**, 202-209.
6. *Pulliero A., Godschalk R., Andreassi M.G., Curfs D., van Schooten E.J., Izzotti A.* (2015) *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **218**, 293-312.
7. *Кутихин А.Г., Синицкий М.Ю., Понасенко А.В.* (2017) Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний, **6**, 92-101. [*Kutikhin A.G., Sinitsky M.Y., Ponasenko A.V.* (2017) *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*, **6**, 92-101.]
8. *Синицкий М.Ю., Шишкова Д.К., Кутихин А.Г., Асанов М.А., Понасенко А.В.* (2020) Гены и Клетки, **14**, 45-49. [*Sinitsky M.Y., Shishkova D.K., Kutikhin A.G., Asanov M.A., Ponasenko A.V.* (2020) *Genes and Cells*, **14**, 45-49.]
9. *Синицкий М.Ю., Цепоккина А.В., Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Понасенко А.В.* (2020) Медицинская генетика, **19**, 38-46. [*Sinitsky M.Y., Tsepokina A.V., Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Ponasenko A.V.* (2020) *Medical Genetics*, **19**, 38-46.]
10. *Sinitsky M.Y., Kutikhin A.G., Tsepokina A.V., Shishkova D.K., Asanov M.A., Yuzhalin A.E., Minina V.I., Ponasenko A.V.* (2020) *Mutat. Res.*, **858-860**, 503252. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2020.503252.
11. *Dessy C., Ferron O.* (2004) *Anti Inflamm. Anti Allergy. Agents Med. Chem.*, **3**, 207-216.
12. *Rosefort C., Fauth E., Zankl H.* (2004) *Mutagenesis*, **19**, 277-284.
13. *Lorge E., Thybaud V., Aardema M.J., Oliver J., Wakata A., Lorenzon G., Marzin D.* (2006) *Mutat. Res.*, **607**, 13-36.
14. *Vandesompele J., de Preter K., Pattyn F., Poppe B., Roy N.V., de Paep A., Speleman F.* (2002) *Genome Biol.*, **3**, research0034.1. DOI:10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
15. *Rink S.M., Lipman R., Alley S.C., Hopkins P.B., Tomasz M.* (1996) *Chem. Res. Toxicol.*, **9**, 382-389.
16. *Stone M.P., Cho Y.J., Huang H., Kim H.Y., Kozekov I.D., Kozekova A., Wang H., Minko I.G., Lloyd R.S., Harris T.M., Rizzo C.J.* (2008) *Acc. Chem. Res.*, **41**, 793-804.
17. *Hoorh C.M., Wagner J.G., Petry T.W., Roth R.A.* (1995) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **130**, 87-94.
18. *Gimbrone M.A., García-Cardeña G.* (2016) *Circ. Res.*, **118**, 620-636.
19. *Canton J., Neculai D., Grinstein S.* (2013) *Nat. Rev. Immunol.*, **13**, 621-634.
20. *Souilhol C., Harmsen M.C., Evans P.C., Krenning G.* (2018) *Cardiovasc. Res.*, **114**, 565-577.
21. *Jiang Y.Z., Jimenez J.M., Ou K., McCormic M.E., Zhang L.D., Davies P.F.* (2014) *Circ. Res.*, **115**, 32-43.
22. *Shishkova D., Velikanova E., Sinitsky M., Tsepokina A., Gruzdeva O., Bogdanov L., Kutikhin A.* (2019) *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 5728. DOI:10.3390/ijms20225728.
23. *Shishkova D., Markova V., Sinitsky M., Tsepokina A., Velikanova E., Bogdanov L., Glushkova T., Kutikhin A.* (2020) *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8802. DOI:10.3390/ijms21228802.
24. *Aboyans V., Lacroix P., Criqui M.H.* (2007) *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **50**, 112-125.
25. *Cahill P.A., Redmond E.M.* (2016) *Atherosclerosis*, **248**, 97-109.

Поступила в редакцию: 17. 02. 2021.  
После доработки: 04. 03. 2021.  
Принята к печати: 09. 03. 2021.

THE GENE EXPRESSION SIGNATURE IN ENDOTHELIAL CELLS EXPOSED TO MITOMYCIN C

*M.Yu. Sinitsky\*, A.V. Tsepokina, A.G. Kutikhin, D.K. Shishkova, A.V. Ponasenko*

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases,  
6 Sosnovy Blvd., Kemerovo, 650002 Russia; \*e-mail: max-sinitsky@rambler.ru

The expression of DNA repair (*DDB1*, *ERCC4*, *ERCC5*), leukocyte adhesion (*VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SELP*), endothelial mechanotransduction (*KLF4*), endothelial differentiation (*PECAM1*, *CDH5*, *CD34*, *NOS3*), endothelial-to-mesenchymal transition (*SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST1*, *GATA4*, *ZEB1*, *CDH2*), scavenger receptors (*LOX1*, *SCARF1*, *CD36*, *LDLR*, *VLDLR*), antioxidant system (*PXDN*, *CAT*, *SOD1*) and transcription factor (*HEY2*) genes in primary human coronary (HCAEC) and internal thoracic (HITAEC) arteries endothelial cells exposed to alkylating mutagen mitomycin C (MMC) was studied at two time points — after 6 h of incubation with MMC and after 6 h of the genotoxic load followed by 24 h of incubation in pure culture medium using the quantitative PCR. Immediately after MMC exposure, in the exposed HCAEC and HITAEC a decreased expression of almost all studied genes was noted excepted *SNAI*, which demonstrated a 4-fold increase in its expression compared to the unexposed control. Elimination of MMC from the cultures, an increased expression of the *VCAM1*, *ICAM1*, *SELE*, *SNAI2*, *KLF4* genes and a decreased the mRNA level of the *PECAM1*, *CDH5*, *CD34*, *ZEB1*, *CAT*, *PXDN* genes were observed in both cell lines. In addition, HITAEC cells were characterized by a decreased expression of the *SOD1*, *SCARF1*, *CD36* genes and an increased expression of the *SNAI1* and *TWIST1* genes; in HCAEC, an increased mRNA level of the *LDLR* and *VLDLR* genes was noted. Thus, MMC-induced genotoxic stress is associated with the endothelial dysfunction.

**Key words:** mutagenesis; atherogenesis; endothelial dysfunction; gene expression

**Funding.** This work was supported by a grant from the President of the Russian Federation for young scientists — candidates of science MK-1228.2021.1.4.

Received: 17.02.2021, revised: 04.03.2021, accepted: 09.03.2021.