

©Коллектив авторов

## ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ СТРЕСС ВЫЗЫВАЕТ ФОРМИРОВАНИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ФЕНОТИПА: ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO*

М.Ю. Синицкий\*, А.В. Сеницкая, 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

Генотоксический стресс может быть одним из триггеров эндотелиальной дисфункции и атеросклероза, однако молекулярно-генетические механизмы этого процесса изучены недостаточно. Воспаление также играет важную роль в атерогенезе. Целью данной работы была оценка уровня маркеров воспаления в первичных эндотелиальных клетках различных артерий человека, культивируемых в условиях мутагенной нагрузки. Первичные эндотелиальные клетки коронарной (HCAEC) и внутренней грудной артерий человека (HITAEC) культивировали в присутствии 500 нг/мл алкилирующего мутагена митомицина С (MMC) (экспериментальная группа) или 0,9% NaCl (контрольная группа). Цитокиновый профиль оценивали методом дот-блоттинга после 6 ч экспозиции клеток MMC с последующими сутками культивирования в чистой культуральной среде. Уровень экспрессии интересующих генов определяли с помощью количественной ПЦР. Установлено, что в обеих клеточных линиях MMC увеличивал секрецию белков IL-8, MCP-1, IP-10 и PDGFB и не влиял на продукцию MIP-1 $\beta$  относительно контроля. Синтез TIMP-2 в экспонированных клетках HCAEC происходил активнее, чем в клетках HITAEC. Белок sTNF RI был выявлен только в клетках HCAEC. Результаты оценки экспрессии генов показали, что клетки HCAEC, экспонированные MMC, характеризуются повышенной экспрессией генов *IL-8*, *MCP-1* и *IP-10*, сниженной экспрессией гена *TIMP-2* и отсутствием изменений уровня мРНК генов *MIP-1 $\beta$*  и *PDGFB* в сравнении с контролем. В экспериментальных клетках HITAEC был отмечен повышенный уровень мРНК *IL-8* и *IP-10*, пониженная экспрессия *TIMP-2*, а экспрессия генов *MCP-1*, *MIP-1 $\beta$*  и *PDGFB* не изменялась. Не была обнаружена экспрессия гена *TNF-RI*. Таким образом, генотоксический стресс в эндотелиальных клетках, индуцированный MMC, приводит к дифференциальному неспецифическому воспалительному ответу, который, в свою очередь, является триггером эндотелиальной дисфункции.

**Ключевые слова:** мутагенез; генотоксический стресс; атерогенез; генная экспрессия; цитокины; воспаление

**DOI:** 10.18097/PBMC20226805361

### ВВЕДЕНИЕ

Согласно статистике, патологии сердечно-сосудистой системы на настоящий момент занимают лидирующую позицию в структуре заболеваемости и смертности как во всём мире, так и в России [1], с ожидаемым ростом к 2030 году до 23 миллионов случаев в год [2]. Причиной абсолютного большинства смертей среди всех патологий сердечно-сосудистого континуума является атеросклероз — мультифакторное заболевание, в основе которого лежит комплексный воспалительный процесс [3]. Начальным этапом атерогенеза является эндотелиальная дисфункция, ассоциированная с синтезом различных факторов роста и провоспалительных цитокинов, являющихся триггером аккумуляции иммунных клеток и компонентов внеклеточного матрикса в стенке кровеносного сосуда [4], что приводит к образованию атеросклеротической бляшки, состоящей из липидного некротизированного ядра, покрытого фиброзной крышкой с большим количеством гладкомышечных клеток [5]. На настоящий момент известно, что генотоксический стресс (помимо классических факторов риска) может служить фактором риска развития эндотелиальной дисфункции и атеросклероза [6], а также триггером воспалительного ответа в различных клетках [7, 8]. Ранее нами было установлено, что шестичасовое культивирование первичных эндотелиальных клеток человека

в присутствии 500 нг/мл алкилирующего мутагена митомицина С (MMC) приводит к выраженному генотоксическому стрессу с сохранением пролиферативной активности клеточных культур [9], ассоциированному с повышением уровня экспрессии генов — маркеров эндотелиальной дисфункции [10, 11].

Учитывая высокий уровень заболеваемости и смертности, вызванной атеросклерозом, а также значительную генотоксическую нагрузку на организм человека (связанную как с естественными, так и антропогенными генотоксическими факторами окружающей среды), понимание молекулярно-генетических механизмов атерогенеза, а также роли генотоксического стресса в данном процессе представляется чрезвычайно важным для современной фундаментальной медицины и сосудистой биологии.

Целью данной работы была оценка уровня маркеров воспаления в культурах первичных эндотелиальных клеток различных артерий человека, культивируемых в условиях мутагенной нагрузки.

### МЕТОДИКА

Материалом исследования послужили коммерческие культуры первичных эндотелиальных клеток коронарной (Human Coronary Artery Endothelial Cells, HCAEC) и внутренней грудной (Human Internal Thoracic Endothelial Cells, HITAEC) артерий

(“Cell Applications”, США). Данные клеточные линии были выбраны в связи с их разной поражаемостью атеросклерозом: так, атеросклеротическое поражение коронарной артерии встречается наиболее часто, в то время как внутренняя грудная артерия практически не подвержена атеросклерозу [12]. Все работы с клеточными культурами проводили в асептических условиях. Клетки культивировали в условиях повышенной влажности, 5%-ого содержания CO<sub>2</sub> при 37°C в среде для роста клеток Human MesoEndo Cell Growth Medium (“Cell Applications”) до достижения 90% конfluентности, после чего 2×10<sup>5</sup> клеток пересевали в 6-луночные культуральные планшеты, содержащие по 2 мл среды для роста клеток в каждой лунке, и культивировали ещё сутки. После окончания культивирования старую среду для роста клеток удаляли и добавляли в каждую лунку 2 мл свежей среды, содержащей 500 нг/мл алкилирующего мутагена MMC (“AppliChem”, Испания) (экспериментальная группа) или 0,9% раствор NaCl (контрольная группа). Экспериментальные и контрольные клетки культивировали в стандартных условиях в течение 6 ч, после чего проводили замену культуральной среды на чистую и культивировали клетки ещё сутки, после чего выводили из эксперимента. Выбор концентрации MMC и времени культивирования в условиях мутагенной нагрузки был обусловлен имеющимися рекомендациями по моделированию мутагенеза *in vitro* [13, 14] и результатами собственных исследований развития эндотелиальной дисфункции в ответ на генотоксический стресс [10, 11].

Цитокиновый профиль изученных клеточных культур оценивали методом дот-блоттинга в культуральной среде, аликвотированной из лунок 6-луночных культуральных планшетов, с использованием коммерческого набора Human Inflammation Antibody Array (“Abcam”, США, кат. номер ab134003), позволяющего выявлять до 40 различных маркеров воспаления, по протоколу производителя набора. Детекцию белков осуществляли на цифровом сканере хемилюминесцентных блотов C-DiGit (“LI-COR”, США). Полуколичественную оценку уровня секреции изученных маркеров воспаления проводили по площади детектируемых секторов с помощью программы ImageJ (National Institutes of Health, США).

Валидацию результатов анализа цитокинового профиля осуществляли путём оценки экспрессии генов, кодирующих молекулы, обнаруженные в результате изучения спектра секретируемых клеточными культурами цитокинов. Для этого было проведено выделение общей РНК из контрольных и экспериментальных эндотелиальных клеток и очистка образцов от геномной ДНК при помощи коммерческого набора RNeasy Plus Universal Mini Kit (“Qiagen”, Германия) по протоколу производителя. Количество и чистоту выделенной РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (“Thermo Scientific”, США), а её качество — на флуориметре Qubit 4 (“Invitrogen”, США), оценивая индекс RIQ (RNA Integrity and Quality) с использованием набора реагентов Qubit RNA IQ Assay Kit (“Invitrogen”). Далее

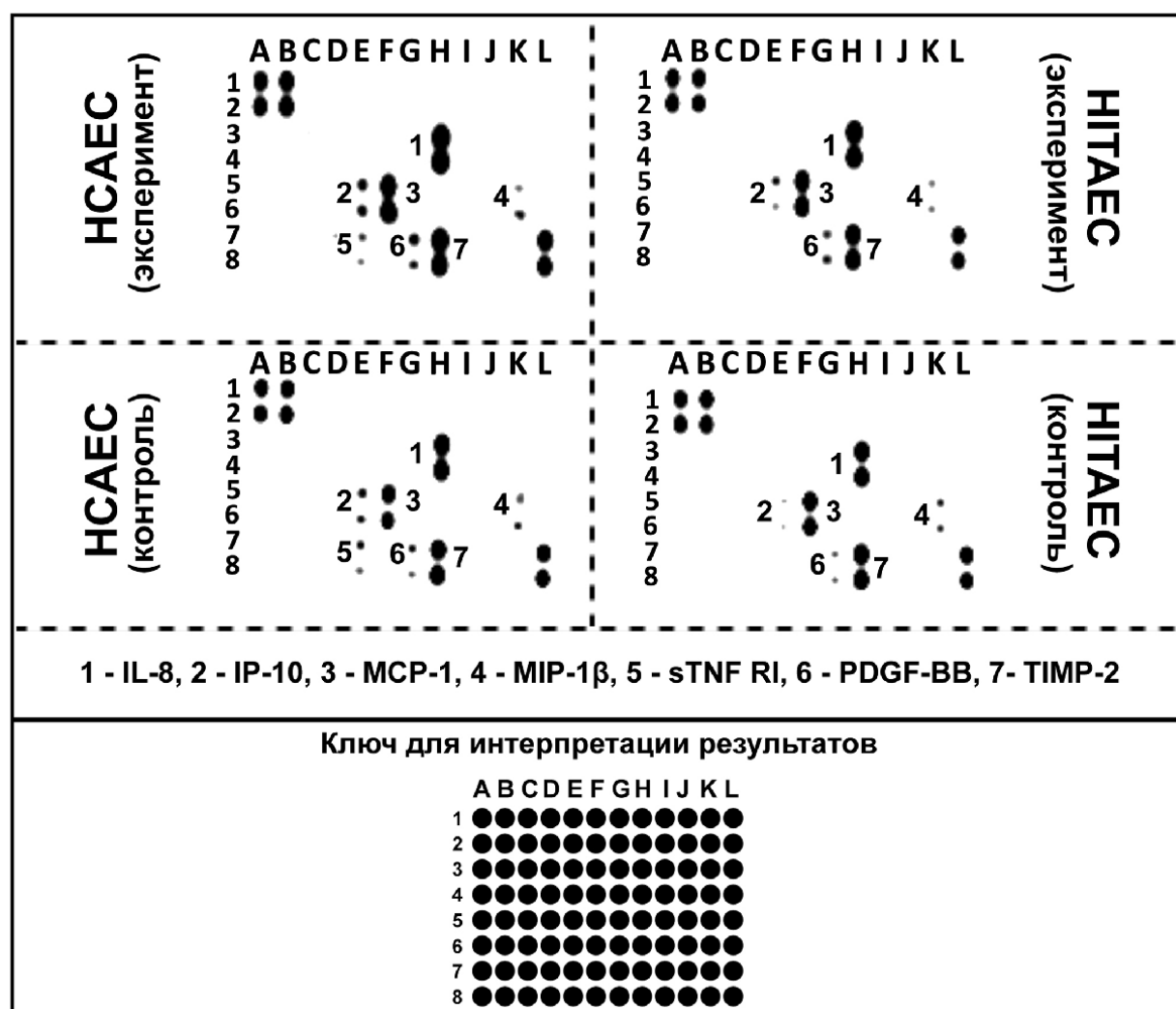
на основе выделенной РНК с помощью реакции обратной транскрипции и набора High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (“Applied Biosystems”, США) была синтезирована комплиментарная ДНК (кДНК). Экспрессию генов оценивали с помощью метода количественной ПЦР с использованием SYBR Green праймеров, изготовленных компанией “Евроген” (Россия), на амплификаторе ViiA 7 (“Applied Biosystems”) в строгом соответствии с существующими стандартами [15]. На каждый образец готовили 10 мкл реакционной смеси, содержащей 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. ПЦР проводили по следующей программе: 2 мин при 50°C (1 цикл), 2 мин при 95°C (1 цикл), 15 с при 95°C и 60 с при 60°C (40 циклов). В качестве референсных были использованы гены *HPRT1*, *GAPDH* и *B2M* (“Евроген”). Уровень экспрессии интересующих генов рассчитывали по методу  $\Delta C_t$  (Уровень экспрессии гена интереса =  $2^{C_t}$  [среднее геометрическое референсных генов] –  $C_t$  [ген интереса]) и выражали в виде условных единиц (у.е.).

Статистическую обработку результатов исследования выполняли в программе GraphPad Prism 9. Для количественных показателей рассчитывали медиану (m) и межквартильный размах (IQR), сравнение двух независимых групп проводили с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия между группами считали статистически значимыми при значениях  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведённого дот-блоттинга в культуральной среде из клеточных культур всех изученных групп обнаружено семь воспалительных маркеров: IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , sTNF RI, PDGF-BB и TIMP-2 (рисунок).

Полуколичественная оценка концентрации обнаруженных молекул в культуральной среде показала, что в клетках обеих изученных линий (HCAEC и HITAEC), обработанных MMC, отмечено увеличение секреции белков IL-8, IP-10, MCP-1 и PDGF-BB, продукция MIP-1 $\beta$  относительно контроля не изменялась. Белок TIMP-2 синтезировался активнее в обработанных MMC клетках HCAEC, но не в клетках HITAEC. Белок sTNF RI был выявлен только в клетках HCAEC, в которых он экспрессировался на одинаковом уровне и в контроле, и в эксперименте (табл. 1). Интересно, что в данном исследовании не был обнаружен IL-6, в то время как в нашем предыдущем исследовании, выполненном с помощью иммуноферментного анализа культуральной среды HCAEC и HITAEC, было обнаружено незначительное количество данного цитокина (от 6 пг/мл до 9 пг/мл) [10]. Вероятно, данное несоответствие результатов связано с недостаточной чувствительностью набора для дот-блоттинга для регистрации относительно невысокого количества IL-6, секретируемого изученными клеточными линиями.



**Рисунок.** Протеомный профиль изученных клеточных культур. A1, 2, B1, 2, L7, 8 – положительный контроль, C1, 2, D1, 2, K7, 8 – отрицательный контроль, I7, 8, J7, 8 – референсная зона, E1, 2 – эотаксин-1 (EOTAXIN), F1, 2 – эотаксин-2 (EOTAXIN-2), G1, 2 – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), H1, 2 – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), I1, 2 – молекула межклеточной адгезии-1 (ICAM-1), J1, 2 – интерферон гамма (IFN- $\gamma$ ), K1, 2 – хемокиновый лиганд-1 (CCL-1), L1, 2 – интерлейкин 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), A3, 4 – интерлейкин 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), B3, 4 – интерлейкин 2 (IL-2), C3, 4 – интерлейкин 3 (IL-3), D3, 4 – интерлейкин 4 (IL-4), E3, 4 – интерлейкин 6 (IL-6), F3, 4 – растворимый рецептор к интерлейкину 6 (IL-6sR), G3, 4 – интерлейкин 7 (IL-7), H3, 4 – интерлейкин 8 (IL-8), I3, 4 – интерлейкин 10 (IL-10), J3, 4 – интерлейкин 11 (IL-11), K3, 4 – субъединица p40 интерлейкина 12 (IL-12 p40), L3, 4 – субъединица p70 интерлейкина 12 (IL-12 p70), A5, 6 – интерлейкин 13 (IL-13), B5, 6 – интерлейкин 15 (IL-15), C5, 6 – интерлейкин 16 (IL-16), D5, 6 – интерлейкин 17 (IL-17), E5, 6 – хемокиновый лиганд-10 (IP-10), F5, 6 – моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1), G5, 6 – моноцитарный хемоаттрактантный белок-2 (MCP-2), H5, 6 – макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), I5, 6 – хемокиновый лиганд-9 (CXCL-9), J5, 6 – макрофагальный белок воспаления-1 альфа (MIP-1 $\alpha$ ), K5, 6 – макрофагальный белок воспаления-1 бета (MIP-1 $\beta$ ), L5, 6 – макрофагальный белок воспаления-1 дельта (MIP-1 $\delta$ ), A7, 8 – хемокиновый лиганд-5 (CCL-5), B7, 8 – трансформирующий фактор роста бета-1 (TGF- $\beta$ 1), C7, 8 – фактор некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ), D7, 8 – фактор некроза опухоли бета (TNF- $\beta$ ), E7, 8 – растворимый рецептор к фактору некроза опухоли альфа (sTNF RI), F7, 8 – растворимый рецептор к фактору некроза опухоли бета (sTNF RII), G7, 8 – тромбоцитарный фактор роста BB (PDGF-BB), H7, 8 – тканевый ингибитор металлопротеиназы-2 (TIMP-2).

Для валидации полученных результатов оценки спектра секретируемых цитокинов был проведён анализ уровня мРНК соответствующих генов. Установлено, что клетки HSAEC, экспонированные ММС, характеризуются повышенной экспрессией генов *IL-8*, *IP-10* и *MCP-1*, сниженной экспрессией гена *TIMP-2* и отсутствием изменений уровня мРНК генов *MIP-1 $\beta$*  и *PDGFB*

в сравнении с контролем. В экспериментальных клетках HITAEC отмечен повышенный уровень мРНК генов *IL-8* и *IP-10*, пониженная экспрессия гена *TIMP-2*, также отсутствие изменений в экспрессии генов *MCP-1*, *MIP-1 $\beta$*  и *PDGFB* относительно контрольной группы. Ген *TNF-RI* не экспрессировался ни в одной из изученных групп (табл. 2).

## ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ, ОБРАБОТАННЫХ МУТАГЕНОМ

Таблица 1. Результаты полуколичественной оценки уровня маркеров воспаления в культуральной среде (условные единицы)

Молекула	НКАЕС		НТАЕС	
	Эксперимент	Контроль	Эксперимент	Контроль
IL-8	67569,91*	62655,89	62644,25*	57274,96
IP-10	31671,14*	22017,52	14416,99*	9277,41
MCP-1	65003,91*	50437,11	60394,06*	50132,57
MIP-1 $\beta$	15499,18	18502,13	17137,51	17042,47
sTNF RI	14504,74	16430,04	—	—
PDGF-BB	24257,36*	14130,28	19775,13*	14403,21
TIMP-2	64648,18*	53571,60	61178,26	58591,74

Примечание: \* – достоверные различия по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ).

Таблица 2. Кратность изменения генной экспрессии в экспонированных митомицином С эндотелиальных клетках относительно неэкспонированного контроля

Ген	Белок	Праймеры	Кратность изменения экспрессии	
			НКАЕС	НТАЕС
IL-8	IL-8	Прямой: CAGAGACAGCAGAGCACAC Обратный: AGTTCTTTAGCACTCCTTGGC	10,9*	2,7*
IP-10	IP-10	Прямой: GGAATCTTTCTGCTTTGGGGTT Обратный: CTTGGGAGGATGGCAGTGGA	5,7*	3,6*
MCP-1	MCP-1	Прямой: TTCTGTGCCCTGCTGCTCATAG Обратный: AGGTGACTGGGGCATTGATTG	2,2*	1,1
MIP-1 $\beta$	MIP-1 $\beta$	Прямой: ACCGCCTGCTGCTTTTCTTAC Обратный: GGATTCAGTGGGATCAGCACA	0,9	0,8
TNF-RI	sTNF RI	Прямой: CCAGGAGAAACAGAACACCGT Обратный: AAACCAATGAAGAGGAGGGATAA	—	—
PDGFB	PDGF-BB	Прямой: AGCTCCGCGCTTTCCGATT Обратный: GGAAAAGGAACACGGCAGTCG	1,2	1,1
TIMP-2	TIMP-2	Прямой: GGCACCAGGCCAAGTTCTTC Обратный: GCCTGCTTATGGGTCCTCGAT	0,6*	0,6*

Примечание: \* – достоверные различия по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ).

Воспаление играет важную роль в атерогенезе и формировании эндотелиальной дисфункции — первого звена атеросклеротического поражения сосуда [3, 16, 17]. Так, показано, что лабораторные мыши, дефицитные по провоспалительному цитокину MCP-1, характеризуются снижением накопления липидов в стенке аорты на 83% относительно контрольной группы [18]. Следует отметить, что спектр провоспалительных молекул, экспрессируемых эндотелиальными клетками и свидетельствующих о провоспалительной активации эндотелия, ограничен и включает в себя такие основные молекулы, как IL-6, IL-8, MCP-1, CXCL1, MIF и PAI-1 [19]. Намного шире спектр выделяемых эндотелиальными клетками факторов ангиогенеза (более двадцати), в число которых также входят проангиогенный PDGF-BB [20] и антиангиогенный TIMP-2 [21], обнаруженные в нашем эксперименте в ходе оценки протеомного профиля культуральной среды эндотелиальных клеток, обработанных ММС. Интересно, что уровень экспрессии генов *PDGFB* и *TIMP-2* отличался от характера экспрессии соответствующих белков PDGF-BB и TIMP-2, что позволяет предположить наличие эпигенетических и посттрансляционных механизмов их биосинтеза. Кроме этого, клетки

НКАЕС и НТАЕС характеризуются различающимся набором маркеров воспаления (а именно, sTNF RI), а также различным уровнем экспрессии изученных молекул, что свидетельствует о дифференциальной чувствительности эндотелиальных клеток различных сосудов к действию алкилирующего мутагена ММС в связи с их физиологическими особенностями. Полученные результаты свидетельствуют о более выраженном воспалительном ответе клеток НКАЕС по сравнению с клетками НТАЕС, что согласуется с данными о повышенной чувствительности коронарной артерии к атеросклеротическому поражению по сравнению с внутренней грудной артерией [12].

Формирование эндотелиальными клетками, обработанными ММС, провоспалительного фенотипа, вероятно, может объясняться обусловленной генотоксическим стрессом и повреждением ДНК активацией сигнального пути NF- $\kappa$ B [22]. В данном случае повреждение ДНК может выступать в качестве DAMP (damage-associated molecular pattern), предупреждающего организм о системной дисфункции и запускающего механизмы репарации повреждений, но, в то же самое время, запускающего атерогенез, однако данная гипотеза требует экспериментального подтверждения [8].

Важно подчеркнуть, что полученные в данной работе результаты основаны только на *in vitro* моделировании мутагенеза в культурах эндотелиальных клеток, а дизайн эксперимента предполагает изучение фундаментальных механизмов действия алкилирующих агентов на эндотелиальные клетки. Для экстраполяции полученных результатов на организм человека необходимо проведение дополнительных исследований на моделях *in vivo*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования установлено, что первичные эндотелиальные клетки различных артерий человека характеризуются дифференциальной чувствительностью к ММС-индуцированному генотоксическому стрессу, что проявляется в различном уровне экспрессии маркеров воспалительного ответа. Обнаруженные изменения фенотипа эндотелиальных клеток на протеомном уровне не всегда подтверждаются на уровне генной экспрессии, что свидетельствует о наличии эпигенетических и посттрансляционных механизмов регуляции синтеза молекул, участвующих в воспалительном ответе эндотелиальных клеток, культивируемых в условиях генотоксической нагрузки.

## 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.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *GBD 2017* (2018) Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, **392**(10159), 1736-1788. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32203-7
2. *Mathers C.D., Loncar D.* (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.*, **3**(11), e442. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030442
3. *Hartman J., Frishman W.H.* (2014) Inflammation and atherosclerosis: A review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy. *Cardiol. Rev.*, **22**(3), 147-151. DOI: 10.1097/CRD.0000000000000021
4. *Libby P., Ridker P.M., Hansson G.K.* (2011) Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis, *Nature*, **473**(7347), 317-325. DOI: 10.1038/nature10146
5. *Bentzon J.F., Otsuka F., Virmani R., Falk E.* (2014) Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ. Res.*, **114**(12), 1852-1866. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302721
6. *Кутихин А.Г., Синицкий М.Ю., Понасенко А.В.* (2017) Роль мутагенеза в развитии атеросклероза. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний, **6**(1), 92-101. [*Kutikhin A.G., Sinitsky M.Y., Ponasenko A.V.* (2017) The role of mutagenesis in atherosclerosis. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*, **6**(1), 92-101.] DOI: 10.17802/2306-1278-2017-1-92-101
7. *Cohen I.* (2017) DNA damage talks to inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **33**, 35-39. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2016.11.002
8. *Poliezhhaieva T., Ermolaeva M.A.* (2017) DNA damage in protective and adverse inflammatory responses: Friend of foe? *Mech. Ageing Dev.*, **165**, 47-53. DOI: 10.1016/j.mad.2016.06.004
9. *Синицкий М.Ю., Шишкова Д.К., Кутихин А.Г., Асанов М.А., Понасенко А.В.* (2020) оценка цитотоксических и генотоксических эффектов митомцина С в культурах эндотелиальных клеток человека. *Гены и Клетки*, **15**(1), 45-49. [*Sinitsky M.Y., Shishkova D.K., Kutikhin A.G., Asanov M.A., Ponasenko A.V.* (2020) Cytotoxic and genotoxic effects of mitomycin C toward human endothelial cells. *Genes and Cells*, **15**(1), 45-49.] DOI: 10.23868/202003006
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) Mitomycin C induced genotoxic stress in endothelial cells is associated with differential expression of proinflammatory cytokines. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, **858-860**, 503252. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2020.503252
11. *Синицкий М.Ю., Цепоккина А.В., Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Понасенко А.В.* (2021) Профиль генной экспрессии в эндотелиальных клетках, культивируемых в присутствии митомцина С. *Биомедицинская химия*, **67**(2), 130-136. [*Sinitsky M.Y., Tsepokina A.V., Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Ponasenko A.V.* (2021) The gene expression signature in endothelial cells exposed to mitomycin C. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **67**(2), 130-136.] DOI: 10.18097/PBMC20216702130
12. *Sims F.H.* (1983) A comparison of coronary and internal mammary arteries and implications of the results in the etiology of arteriosclerosis. *Am. Heart J.*, **105**(4), 560-566. DOI: 10.1016/0002-8703(83)90478-7
13. *Rosefort C., Fauth E., Zankl H.* (2004) Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis*, **19**(4), 277-284. DOI: 10.1093/mutage/geh028
14. *Lorge E., Thybaud V., Aardema M.J., Oliver J., Wakata A., Lorenzon G., Marzin D.* (2006) SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutat. Res.*, **607**(1), 13-36. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2006.04.006
15. *Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellems J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T.* (2009) The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, **55**(4), 611-622. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797
16. *Apostolakis S., Vogiatzi K., Amanatidou V., Spandidos D.A.* (2009) Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.*, **84**(3), 353-360. DOI: 10.1093/cvr/cvp241

17. Gisterå A., Hansson G.K. (2017) The immunology of atherosclerosis. *Nat. Rev. Nephrol.*, **13**(6), 368-380. DOI: 10.1038/nrneph.2017.51
18. Gu L., Okada Y., Clinton S.K., Gerard C., Sukhova G.K., Libby P., Rollins B.J. (1998) Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol. Cell*, **2**(2), 275-281. DOI: 10.1016/s1097-2765(00)80139-2
19. Kutikhin A.G., Tupikin A.E., Matveeva V.G., Shishkova D.K., Antonova L.V., Kabilov M.R., Velikanova E.A. (2020) Human peripheral blood-derived endothelial colony-forming cells are highly similar to mature vascular endothelial cells yet demonstrate a transitional transcriptomic signature. *Cells*, **9**(4), 876. DOI: 10.3390/cells9040876
20. Wu L.W., Chen W.L., Huang S.M., Chan J.Y. (2019) Platelet-derived growth factor-AA is a substantial factor in the ability of adipose-derived stem cells and endothelial progenitor cells to enhance wound healing. *FASEB J.*, **33**(2), 2388-2395. DOI: 10.1096/fj.201800658R
21. Reed M.J., Koike T., Sadoun E., Sage E.H., Puolakkainen P. (2003) Inhibition of TIMP1 enhances angiogenesis *in vivo* and cell migration *in vitro*. *Microvasc. Res.*, **65**(1), 9-17. DOI: 10.1016/s0026-2862(02)00026-2
22. Sabatel H., Pirlot C., Piette J., Habraken Y. (2011) Importance of PIKKs in NF-κB activation by genotoxic stress. *Biochem. Pharmacol.*, **82**(10), 1371-1383. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.07.105

Поступила в редакцию: 27. 04. 2022.  
После доработки: 01. 08. 2022.  
Принята к печати: 30. 08. 2022.

## GENOTOXIC STRESS LEADS TO THE PROINFLAMMATORY RESPONSE OF ENDOTHELIAL CELLS: AN *IN VITRO* STUDY

M.Y. Sinitsky\*, A.V. Sinitskaya, 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

It was shown, that genotoxic stress can trigger endothelial dysfunction and atherosclerosis, but the molecular genetic mechanisms of this process are poorly investigated. At the same time, inflammation also plays the important role in atherogenesis. This study aimed access of inflammatory marker expression in the endothelial cells exposed to alkylating mutagen mitomycin C (MMC). Primary human coronary (HCAEC) and internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC) exposed to 500 ng/ml MMC (experimental group) and 0.9% NaCl (control) were used in this research. A gene expression profile was evaluated by quantitative reverse transcription PCR after 6 h exposure of endothelial cells to MMC (or 0.9% NaCl) followed by subsequent 24 h incubation in the mutagen-free cell growth media. The cytokine profile of endotheliocytes was studied by dot blotting. We found that MIF, IL-8, MCP-1, IP-10 and PDGFB were upregulated both in HCAEC and HITAEAC, while MIP-1β release remained unchanged. TIMP-2 was upregulated in HCAEC but not in HITAEAC. sTNF RI was expressed only in HCAEC. According to gene expression analysis, HCAEC exposed to MMC are characterized by the increased mRNA level of *IL-8*, *MCP-1* and *IP-10*; decreased expression of *TIMP-2* and no differences in the expression of *MIF*, *MIP-1β* and *PDGFB* compared to the control. In HITAEAC, increased mRNA level of *IL-8* and *IP-10*; decreased expression of *MIF* and *TIMP-2*, no differences in the expression of *MCP-1*, *MIP-1β* and *PDGFB* was shown. *TNF-RI* expression was not detected in both cell lines. Thus, genotoxic stress in endothelial cells induced by MMC leads to differential inflammatory response that can trigger endothelial dysfunction.

**Key words:** mutagenesis; genotoxic stress; atherogenesis; gene expression; cytokines; inflammation

**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: 27.04.2022; revised: 01.08.2022; accepted: 30.08.2022.