

Особенности секреции и генной экспрессии проатеросклеротических цитокинов IL-6 и IL-8 в культурах эндотелиальных клеток, культивируемых в условиях мутагенной нагрузки

Синицкий М.Ю., Цепокина А.В., Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Понасенко А.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»
650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6

Атеросклероз занимает лидирующую позицию в структуре заболеваемости и смертности среди всей сердечно-сосудистой патологии как в России, так и во всем мире. Имеются свидетельства того, что в развитии эндотелиальной дисфункции, являющейся первым этапом атерогенеза, помимо классических факторов риска также играют роль соматические мутации, а в атеросклеротических бляшках и пораженных сосудах отмечается повышенный уровень различных ДНК аддуктов. Однако остается открытым вопрос о фундаментальных основах роли соматических мутаций в патогенезе атеросклероза, что наиболее важно в условиях увеличения генотоксической нагрузки на организм человека, особенно в регионах с развитой промышленностью. Целью данного исследования явилось изучение особенностей секреции проатеросклеротических цитокинов IL-6 и IL-8 и экспрессии их генов в культурах первичных эндотелиальных клеток коронарной и внутренней грудной артерий, различающихся по степени подверженности атеросклерозу и экспонированных мутагеном алкилирующего механизма действия митомицином С. Концентрация изученных цитокинов в культуральной среде и уровень мРНК соответствующих генов измерялись методами количественной полимеразной цепной реакции и иммуноферментного анализа в двух временных точках – непосредственно после 6 часов экспозиции клеток митомицином С (первая временная точка) и после 6 часов экспозиции клеток мутагеном с последующими сутками культивирования в культуральной среде без митомицина С (вторая временная точка). Установлено, что в первой временной точке в экспонированных митомицином С культурах наблюдается статистически значимое снижение секреции и экспрессии гена *IL8*, а также снижение уровня мРНК гена *IL6*. Во второй временной точке, наоборот, концентрация и уровень мРНК гена *IL8*, а также генная экспрессия *IL6* резко возрастали в культурах, экспонированных митомицином С по сравнению с неэкспонированным контролем ($p < 0,01$), причем эндотелиальные клетки коронарной артерии, наиболее часто поражаемой атеросклерозом, были более чувствительны к мутагенному воздействию, чем эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии, в наименьшей степени подверженной атерогенезу. Таким образом, впервые в эксперименте *in vitro* показаны мутаген-индуцированные изменения характера секреции и экспрессии генов проатеросклеротических цитокинов IL-6 и IL-8 в культурах первичных эндотелиальных клеток различных артерий человека.

Ключевые слова: мутагенез, атеросклероз, эндотелиальные клетки, коронарная артерия, внутренняя грудная артерия, митомицин С, цитокины, экспрессия генов, ИФА.

Для цитирования: Синицкий М.Ю., Цепокина А.В., Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Понасенко А.В. Особенности секреции и генной экспрессии проатеросклеротических цитокинов IL-6 и IL-8 в культурах эндотелиальных клеток, культивируемых в условиях мутагенной нагрузки. *Медицинская генетика* 2020; 19(12): 38-46.

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.12.38-46

Автор для корреспонденции: Синицкий Максим Юрьевич; **e-mail:** max-sinitsky@rambler.ru

Финансирование. Комплексная программа фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2019-0003.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Поступила: 10.10.2020.

Secretion and gene expression of proatherosclerotic cytokines IL6 and IL8 by endothelial cells exposed to mutagen

Sinitsky M.Yu., Tsepokina A.V., Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Ponasenkov A.V.

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases
Sosnovy Blvd. 6, Kemerovo, 650002, Russia

Atherosclerosis is a leader in morbidity and mortality among all cardiovascular pathologies both in Russia and around the world. Nowadays there are evidences that somatic mutations in addition to classical risk factors can play a role in the development of endothelial dysfunction – the initial stage of atherogenesis, and atherosclerotic plaques are characterized by increased level of various DNA adducts. At the same time, a fundamental base of the contribution of mutagenesis to atherogenesis is still unstudied

thought it is important for industrial regions with high genotoxic risk. The aim of this research was to study the secretion and gene expression of proatherosclerotic cytokines IL-6 and IL-8 by primary human coronary- and internal thoracic artery endothelial cells characterized by different sensitivity to atherogenesis and exposed to alkylating mutagen mitomycin C. Concentration of the studied cytokines in culture medium and mRNA level of the corresponding genes were measured using quantitative polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay at two time points – immediately after 6 hours of cell incubation with mitomycin C and after 6 hours of cell incubation with mutagen followed by 24 hours incubation in the complete media without mitomycin C. It was found that at the first time point, a significant decrease in the secretion and gene expression of IL-8, as well as a decrease in the mRNA level of the *IL-6* gene in the exposed culture was discovered. At the second time point, on the contrary, the concentration and mRNA level of IL-8, as well as expression of the *IL6* gene sharply increased in cultures exposed to mitomycin C in comparison with control ($p < 0.01$), and the coronary artery cells were more sensitive to mutagenic effects than the cells of the internal thoracic artery. Thus, for the first time in *in vitro* experiment, mutagen-induced changes in the secretion and gene expression of proatherosclerotic cytokines IL-6 and IL-8 in primary human endothelial cells derived from various arteries have been shown.

Keywords: mutagenesis, atherosclerosis, endothelial cells, coronary artery, internal thoracic artery, mitomycin C, cytokines, gene expression, ELISA.

For citation: Sinitsky M.Yu., Tsepokina A.V., Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Ponasenkov A.V. Secretion and gene expression of proatherosclerotic cytokines IL6 and IL8 by endothelial cells exposed to mutagen. *Medical genetics*. 2020; 19(12): 38-46. (In Rus.).

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.12.38-46

Corresponding author: Sinitsky Maxim Yurevich; **e-mail:** max-sinitsky@rambler.ru

Funding. The Complex Program of Fundamental Research of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences within the framework of the fundamental research project of Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases No. 0554-2019-0003.

Conflict of interest. Author declare no conflicts of interest.

Accepted: 10.10.2020.

Введение

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно от сердечно-сосудистых заболеваний умирает более 17 миллионов человек, при этом лидирующую позицию в структуре заболеваемости и смертности среди всех патологий сердечно-сосудистой системы как в России, так и во всем мире занимает атеросклероз [1]. На настоящий момент обсуждается вопрос вклада соматических мутаций в атерогенез, а также имеются работы, свидетельствующие о том, что повреждение ДНК, наряду с классическими факторами риска (гиперхолестеринемия, сахарный диабет, курение и др.), играет важную роль в развитии эндотелиальной дисфункции [2]. В частности, было установлено, что ДНК клеток атеросклеротических бляшек характеризуется более высокой степенью повреждения, чем ДНК клеток здоровых тканей [3], а в пораженной атеросклерозом аорте уровень 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина (продукт окислительного повреждения ДНК) в 2,8 раза выше в интиме в сравнении с медией [4]. Данный градиент может возникать в результате экспозиции интимы мутагенам окружающей среды [5]. Принимая во внимание тот факт, что на организм человека постоянно воздействует целый ряд химических и физических факторов как естественной, так и антропогенной природы, способных индуцировать повреждение ДНК и способствовать возникновению соматических мутаций, проблема оценки вклада мутагена в формирование атеросклероза имеет не только

фундаментальное, но и прикладное значение для современной медицины. Данная проблема в последние годы становится наиболее важной, учитывая постоянно увеличивающийся генотоксический риск из-за урбанизации и ухудшения экологической обстановки.

К числу наиболее распространенных и критических последствий генотоксического воздействия на организм человека относят образование поперечных сшивок молекулы ДНК, которые приводят к нарушению процессов репликации и транскрипции, а также к запуску механизмов апоптоза [6]. Повреждения такого типа могут происходить при воздействии на организм человека различных эндогенных (продукт перекисного окисления липидов и биосинтеза простагландинов – малоновый диальдегид, побочный продукт метаболизма нитритов и результат взаимодействия с водой эндогенного оксида азота – азотистая кислота и свободные радикалы) [7, 8, 9] и экзогенных факторов (ионизирующая радиация, компоненты табачного дыма, автомобильных выхлопов и выбросов промышленных предприятий – различные альдегиды, акролеин, алкилгалогениды, алкены, спирты, кетоны, эфиры и сульфиды) [8]. В экспериментах *in vitro* в качестве модельного агента, вызывающего образование поперечных сшивок ДНК, наиболее часто используются одноцентровый мутаген митомицин С (ММС) [6], который в ходе реакции *N*-алкилирования взаимодействует с 7-*N*-гуаниновыми нуклеотидными остатками малой

бороздки ДНК в месте расположения димеров CG [10]. Данный мутаген обладает рядом преимуществ, позволяющих использовать его в экспериментах по моделированию мутагенеза. Он хорошо растворяется в физиологическом растворе, обладает высокой стабильностью в растворенном состоянии и сохраняет свою мутагенную и цитогенетическую активность при температурах до 37°C в течение нескольких часов.

Согласно современным концепциям, в основе атеросклероза лежит воспалительный процесс. Атеросклеротическое поражение сосуда начинается с миграции в интиму моноцитов, которые трансформируются в макрофаги и начинают поглощать свободный и этерифицированный холестерин, в результате чего происходит образование пенистых клеток. Пенистые клетки и тромбоциты, также мигрировавшие в интиму из крови, секретируют факторы роста и митогены, которые способствуют пролиферации гладкомышечных клеток и выработке внеклеточного матрикса, что усиливает степень атеросклеротического поражения. Установлено, что такие провоспалительные цитокины, как интерлейкин 6 (IL-6) и интерлейкин 8 (IL-8), играют центральную роль в развитии воспалительного процесса, ассоциированного с атерогенезом, что позволяет использовать их в качестве маркеров при оценке проатеросклеротических изменений в фенотипе эндотелиальных клеток [11, 12]. Известно также, что сосуды разных типов в силу своих гидродинамических и физиологических особенностей отличаются степенью подверженности к развитию атеросклероза. Так, к числу наиболее часто поражаемых относят коронарную артерию, а к числу наименее подверженных атерогенезу — внутреннюю грудную артерию [13].

Таким образом, целью данного исследования явилось определение особенностей секреции и генной экспрессии проатеросклеротических цитокинов IL-6 и IL-8 в культурах первичных эндотелиальных клеток человека, экспонированных мутагеном алкилирующего механизма действия.

Материалы и методы

Материалом исследования послужили коммерческие культуры первичных эндотелиальных клеток коронарной (Human Coronary Artery Endothelial Cells, HCAEC) и внутренней грудной (Human Internal Thoracic Artery Endothelial Cells, HITAEC) артерий (Cell Applications Inc., США), полученные от доноров-мужчин 27 и 50 лет, соответственно. Все манипуляции с клеточными культурами проводили в асептических условиях в боксе абактериальной воздушной среды БАВп-01-«Ламинар-С»-1,8 класса II/типа А2 биоло-

гической безопасности (Lamsystems, Миасс, Россия) в соответствии с протоколом, рекомендованным компанией-производителем. Криопробирки с клеточными культурами размораживали, клетки переносили в культуральные флаконы T-75 (Greiner, Австрия) и культивировали при температуре 37°C, 5% CO₂ и повышенной влажности в CO₂-инкубаторе Sanyo MCO-19AIC (Япония) в присутствии 15 мл среды для роста клеток Human MesoEndo Cell Growth Medium (Cell Applications Inc., США) до достижения 90% конфлюэнтности. Каждые 24 часа проводили замену культуральной среды. После 4-х пассажей клетки трипсинизировали в течение 1 минуты смесью трипсин/ЭДТА (Cell Applications Inc., США) и пересеивали 2×10^5 клеток в 6-луночные ТС-обработанные планшеты для клеточных культур (Eppendorf, Германия), в каждую лунку добавляли 2 мл культуральной среды и культивировали клетки в стандартных условиях еще 24 часа. На каждую клеточную линию готовили по восемь планшетов.

Общая схема эксперимента представлена на **рис. 1**. По окончании культивирования старую среду для роста клеток удаляли и приливали в каждую лунку четырех планшетов с клетками каждой клеточной линии 2 мл свежей среды, содержащей в качестве модельного мутагена ММС (AppliChem, Испания) в концентрации 500 нг/мл (экспериментальная группа). В оставшиеся планшеты добавляли свежую среду, содержащую 0,9% раствор NaCl (неэкспонированный контроль). Контрольные и экспериментальные планшеты культивировали в течение 6 часов в заданных условиях. Выбор концентрации ММС и времени культивирования в условиях мутагенной нагрузки был обусловлен имеющимися общепринятыми рекомендациями проведения экспериментов по моделированию мутагенеза *in vitro* [14, 15]. По истечении 6 часов (точка 1) два контрольных и два экспериментальных планшета с клетками HCAEC и HITAEC выводили из эксперимента и отправляли на иммунохимический и молекулярно-генетический анализ. В оставшихся планшетах меняли культуральную среду на свежую, без добавления каких-либо агентов, и культивировали их еще сутки (точка 2), после чего также выводили из эксперимента.

Концентрацию проатеросклеротических цитокинов IL-6 и IL-8 в контрольных и экспериментальных образцах оценивали в точке 1 и точке 2 методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов IL-6 Human SimpleStep ELISA Kit (Abcam, Англия) и IL-8 Human ELISA Kit (Abcam, Англия). Культуральную среду разделяли на аликваты по 0,5 мл и хранили при температуре -60°C до начала следующей стадии эксперимента. Перед началом экс-

перимента пробирку с культуральной средой размораживали при комнатной температуре и дальнейшие манипуляции выполнялись в соответствии со стандартным протоколом, рекомендованным производителем наборов. Измерение оптической плотности образцов проводили на спектрофотометре АИФР-01 УНИПЛАН (ЗАО «Пикон», Москва, Россия).

Уровень мРНК генов *IL6* и *IL8* также оценивался в точке 1 и точке 2. Из каждой лунки 6-луночного планшета удаляли культуральную среду (которая затем использовалась для оценки секреции изучаемых цитокинов методом ИФА), клетки двукратно отмывали холодным фосфатно-солевым буфером и лизировали 1 мл регента QIAzol® Lysis Reagent (Qiagen, Германия). Выделение тотальной РНК из клеток осуществляли с использованием коммерческих наборов RNeasy® Plus Universal Mini Kit (Qiagen, Германия) по стандартному протоколу, предложенному производителем. Очистка образцов РНК от геномной ДНК проводилась в процессе выделения с помощью специального реагента, включенного в состав набора для выделения РНК. Выделенную РНК разделяли на аликвоты по 10 мкл и хранили до начала следующей стадии эксперимента при температуре -80°C. Все ра-

бочие поверхности и оборудование, использованное для выделения РНК, перед началом эксперимента обрабатывались ингибитором РНКаз RNaseZap™ RNase Decontamination Solution (Invitrogen, США). Целостность выделенной РНК оценивалась на спектрофотометре Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen, США) путем измерения RIQ (RNA Integrity and Quality) индекса с использованием набора реагентов Qubit RNA IQ Assay Kit (Invitrogen, США). На основе 100 нг выделенной РНК путем реакции обратной транскрипции с использованием коммерческих наборов High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США) синтезировали комплементарную ДНК (кДНК) и хранили ее при температуре -20°C. Количество и качество РНК и кДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, США). В эксперименте было выделено от 260,4 до 601,8 нг/мкл РНК с достаточной чистотой (коэффициенты $A_{260/280}$ и $A_{260/230}$ составили 2,05 – 2,09 и 1,82 – 2,25, соответственно) и целостностью (RIQ индекс больше 93%). Оценку экспрессии генов *IL6* и *IL8* проводили методом количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (реал-тайм ПЦР) на амплификаторе ViiA7 (Applied Biosystems, США) с исполь-

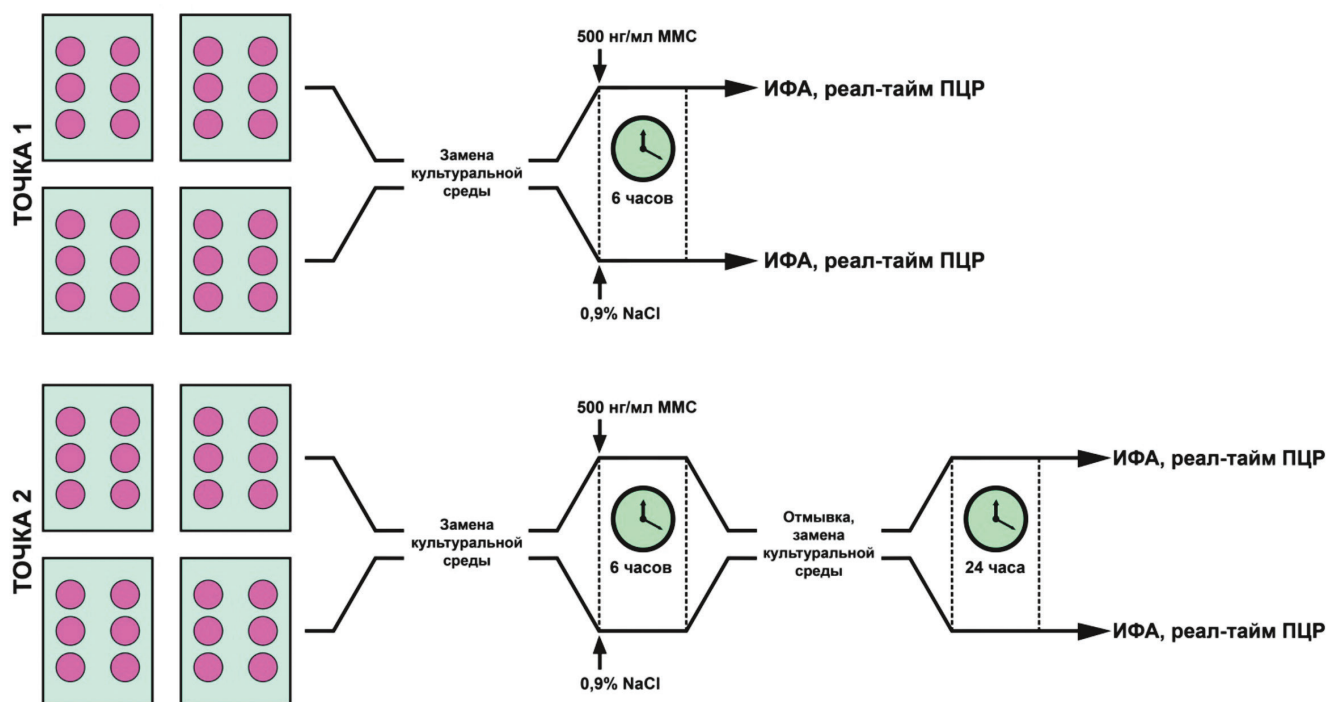


Рис. 1. Схематическое изображение дизайна эксперимента (для одной клеточной линии).

Примечание: ММС – митомицин С, ИФА – иммуноферментный анализ, ПЦР – полимеразная цепная реакция.

зованием TaqMan зондов TaqMan™ Gene Expression Assay (Applied Biosystems, США) Hs00174131_m1 (*IL-6*) и Hs00174103_m1 (*IL-8*). ПЦР проводили в планшете (Axygen, США, каталожный номер PCR-96-AB-C), содержащем 26 анализируемых образцов, 5 стандартов с двукратным разведением и отрицательный контроль (реакционная смесь без кДНК). Каждый анализируемый образец, стандарт и отрицательный контроль анализировался в трех технических репликатах. На каждый образец готовили 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мкл мастер-микса TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, США), 1 мкл TaqMan™ Gene Expression Assay (Applied Biosystems, США) и 9 мкл кДНК в концентрации 50 нг/мкл. Амплификация осуществлялась по следующей программе: 2 минуты при 50°C, 10 минут при 95°C, 40 циклов 15 секунд при 95°C и 60 секунд при 60°C. Нормирование результатов ПЦР проводилось с помощью среднего геометрического значения *Ct* трех референсных генов *HPRT1*, *GAPDH* и *B2M* (Applied Biosystems, США). Экспрессия генов *IL6* и *IL8* рассчитывалась по методу ΔC_t (Уровень экспрессии = $2^{Ct \text{ референсные гены} - Ct \text{ [ген интереса]}}$). Качество реакции амплификации оценивали путём анализа кривых амплификации и стандартных кривых в программе QuantStudio™ Real-Time PCR Software v.1.3 (Applied Biosystems, США). Амплификацию считали успешной при эффективности 90–110%, значении $R^2 > 0,990$ и отсутствии амплификации в отрицательном контроле.

Статистическая обработка результатов исследования была выполнена в программах StatSoft STATISTICA 10 с помощью блока непараметрической статистики и GraphPad Prism 7. Для количественных показателей рассчитывали медиану (*m*) и межквартильный размах (*IQR*). Различия между группами оценивали с помощью рангового *U*-критерия Манна-Уитни. Различия между группами считались статистически значимыми при значениях $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение

В данном эксперименте были выбраны две временные точки, в которых проводилась оценка секреции и генной экспрессии проатеросклеротических цитокинов *IL-6* и *IL-8*. Выбор первой точки (6 часов) основан на принятых на настоящий момент рекомендациях по изучению особенностей проявления кластогенных эффектов различных соединений в экспериментах *in vitro*, согласно которым экспозиция клеточных культур мутагенами проводится именно в течение 6 часов [15]. За этот период клетки в экспонированных культурах не теряют своей жизнеспособности и митоген-

ной активности, а данного времени достаточно для возникновения ММС-индуцированных повреждений ДНК. Вторая временная точка (сутки культивирования в чистой культуральной среде) была использована для оценки отложенных эффектов мутагенного воздействия на культуры после завершения одного митотического цикла в результате реализации возникших повреждений генетического аппарата эндотелиоцитов.

Результаты оценки уровня секреции *IL-6* и *IL-8* эндотелиальными клетками НСАЕС и НТАЕС, культивируемыми в условиях генотоксической нагрузки, а также в контрольных образцах, представлены на **рис. 2**.

Определено, что концентрация *IL-6* в культурах НСАЕС и НТАЕС, экспонированных ММС, не отличалась от контрольных образцов ни в точке 1, ни в точке 2. Более интересные данные были получены по уровню секреции *IL-8*. В точке 1 непосредственно после воздействия мутагена отмечено снижение концентрации данного цитокина в обеих клеточных линиях, экспонированных ММС, однако после элиминирования из культуры мутагенного фактора секреция *IL-8* резко возрастала в экспериментальных культурах по сравнению с контролем (**рис. 2**). Несмотря на то, что медиана данного цитокина во второй временной точке была несколько выше в культурах НТАЕС по сравнению с культурами НСАЕС ($477,40 \pm 77,15$ пг/мл и $401,05 \pm 118,90$ пг/мл, соответственно), расчет кратности изменения секреции в экспериментальных образцах относительно контроля ($329,55 \pm 70,00$ пг/мл в культуре НТАЕС и $249,55 \pm 52,70$ пг/мл в культуре НСАЕС) показал, что наблюдается тенденция к менее выраженному увеличению концентрации *IL-8* в культуре НТАЕС (в 1,46 раз) по сравнению с культурой НСАЕС (в 1,61 раз).

Данные биохимического анализа *IL-8* подтверждаются результатами оценки генной экспрессии (**рис. 3**). В точке 1 было отмечено снижение экспрессии гена *IL8* в экспонированных культурах (в 1,58 раза для культур НСАЕС и в 1,62 для культур НТАЕС), а в точке 2, наоборот, резкое увеличение количества мРНК данного гена (в 10,94 раза для культур НСАЕС и в 2,74 – для культур НТАЕС) в сравнении с контролем ($p = 0,000032$).

Несмотря на то, что при мы не получили значимых различий по концентрации *IL-6* в культуральной среде, его генная экспрессия изменялась так же, как экспрессия гена *IL8* – снижалась непосредственно после воздействия ММС и повышалась после суток последующего культивирования в чистой культуральной среде, что позволяет предположить наличие эпигенетических механизмов регуляции его экспрессии. Сто-

ит отметить, что линия НТАЕС характеризовалась менее выраженным повышением экспрессии данного цитокина (в 2,36 раза) по сравнению с линией НСАЕС (в 3,56 раза, $p = 0,004669$).

Обоснованием полученных нами результатов могут служить данные о том, что атеросклеротическое поражение сосуда начинается с миграции в интиму моноцитов крови, которые адгезируются на поверхности эндотелиоцитов за счет молекул клеточной адгезии, экспрессия которых повышается в ответ на действие различных воспалительных цитокинов. Далее хемокины способствуют миграции моноцитов в интиму, где последние трансформируются в макрофаги. Так, у LDLR-нокаутных мышей элиминирование хемокина MCP-1 приводило к снижению количества перегруженных липидами макрофагов в сосудистой стенке на 83% [16].

IL-6 является одним из ключевых цитокинов с доказанным проатеросклеротическим эффектом, он играет центральную роль в воспалении, приводящем к развитию атеросклероза. В частности, он ассоциирован с дислипидемией и развитием эндотелиальной дисфункции, а также с такими факторами сердечно-сосудистого риска, как инсулинорезистентность и гипертония [11]. Было показано, что повышенная концентрация данного цитокина является предиктором смертности в 5-летний период от заболеваний сердечно-сосудистой системы, не зависящим от традиционных факторов риска развития атеросклероза [17]. IL-6 выполняет множество функций, которые и обуславливают его проатеросклеротический эффект. Он активирует синтез белков острой фазы воспаления, активацию эндотелиальных клеток, коагуляцию, гипо-

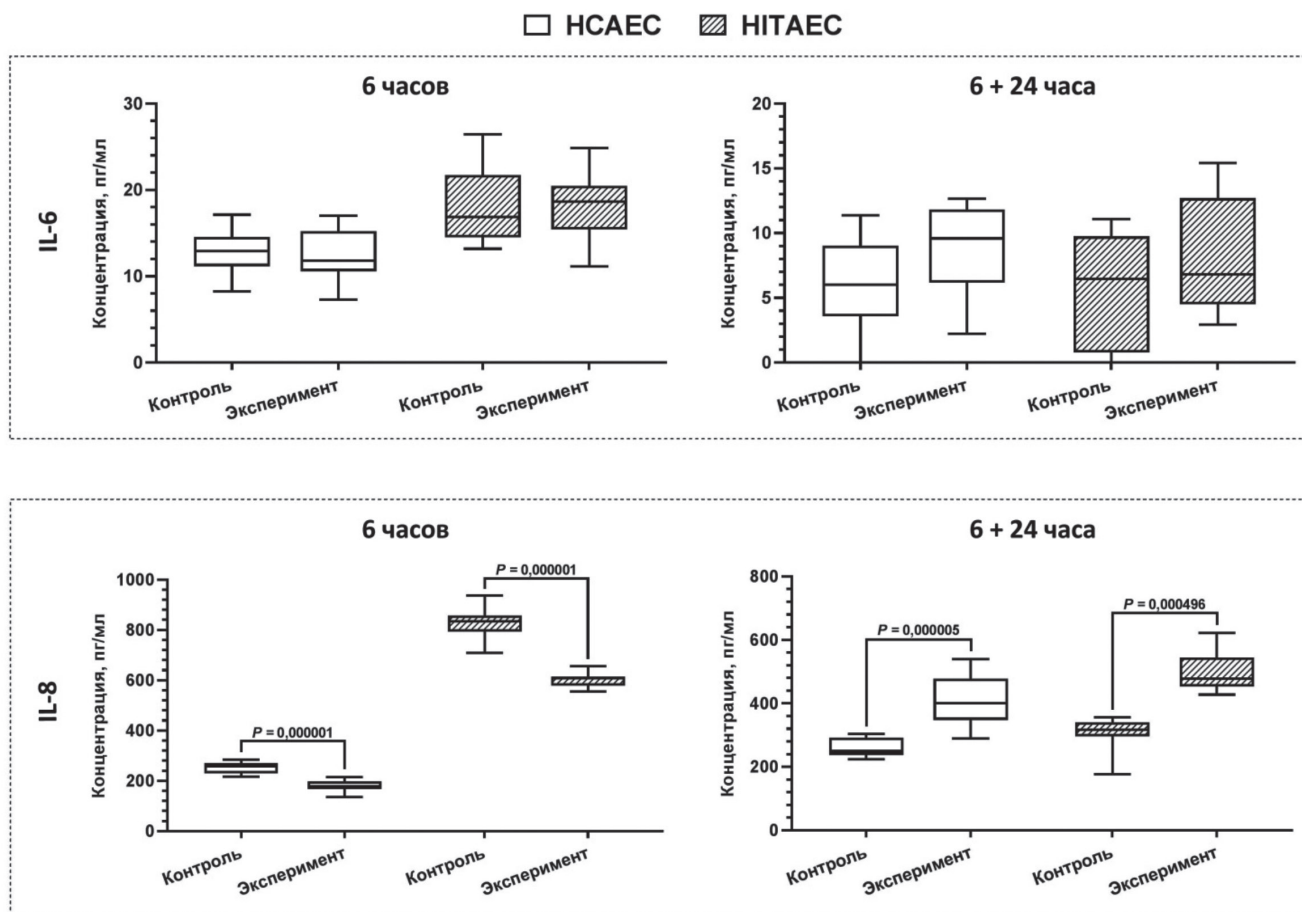


Рис. 2. Концентрация проатеросклеротических цитокинов в клеточных культурах в зависимости от времени культивирования.

Примечание: границы «ящика» – первый и третий квартили, линия посередине – медиана, концы «усов» – минимальное и максимальное наблюдаемое значение по выборке.

таламо-гипофизарно-надпочечниковую систему, пролиферацию и дифференциацию лимфоцитов. Все эти механизмы вовлечены в различные этапы атерогенеза и влияют на развитие, прогрессирование и прогноз атеросклероза. IL-6 в значительной степени ответственен за запуск каскада иммунных реакций: эндотелиоциты отвечают на связывание IL-6 с его водорастворимым рецептором, выработкой хемокинов и усилением экспрессии молекулы клеточной адгезии ICAM-1, что активирует трансмембранную инфильтрацию моноцитов в интиму [18].

IL-8 относится к семейству хемокинов — небольших цитокинов (с молекулярной массой от 8 до 20 кДа), ответственных за хемотаксис чувствительных к ним клеток к очагу воспаления. Повышение содержания окисленных липопротеинов низкой плотности в субэндотелиальном пространстве активирует синтез целого ряда хемокинов (MCP-1, FKN, GRO- α) гладкомы-

шечными и эндотелиальными клетками. Растворимый MCP-1 вызывает структурные изменения в цитоскелете моноцитов, адгерируемых к эндотелию, стимулируя их трансэндотелиальную миграцию в интиму. Одновременно с этим СХС-хемокины взаимодействуют с Т-лимфоцитами, увеличивая тем самым сосудистую воспалительную реакцию. Хоминг нейтрофилов и сосудистых прогениторных клеток, связанных с атеросклерозом, контролируется CXCR-2 и CXCR-4, а также их лигандом IL-8 (CXCL-8). IL-8 активно экспрессируется поврежденными макрофагами, а также эндотелиальными и гладкомышечными клетками, и способствует прочной адгезии моноцитов к эндотелиальным клеткам [12, 19].

Полученные в нашей работе результаты демонстрируют ассоциации генотоксического стресса, вызванного действием на культуры эндотелиальных клеток мутагена MMC с алкилирующим механизмом дей-

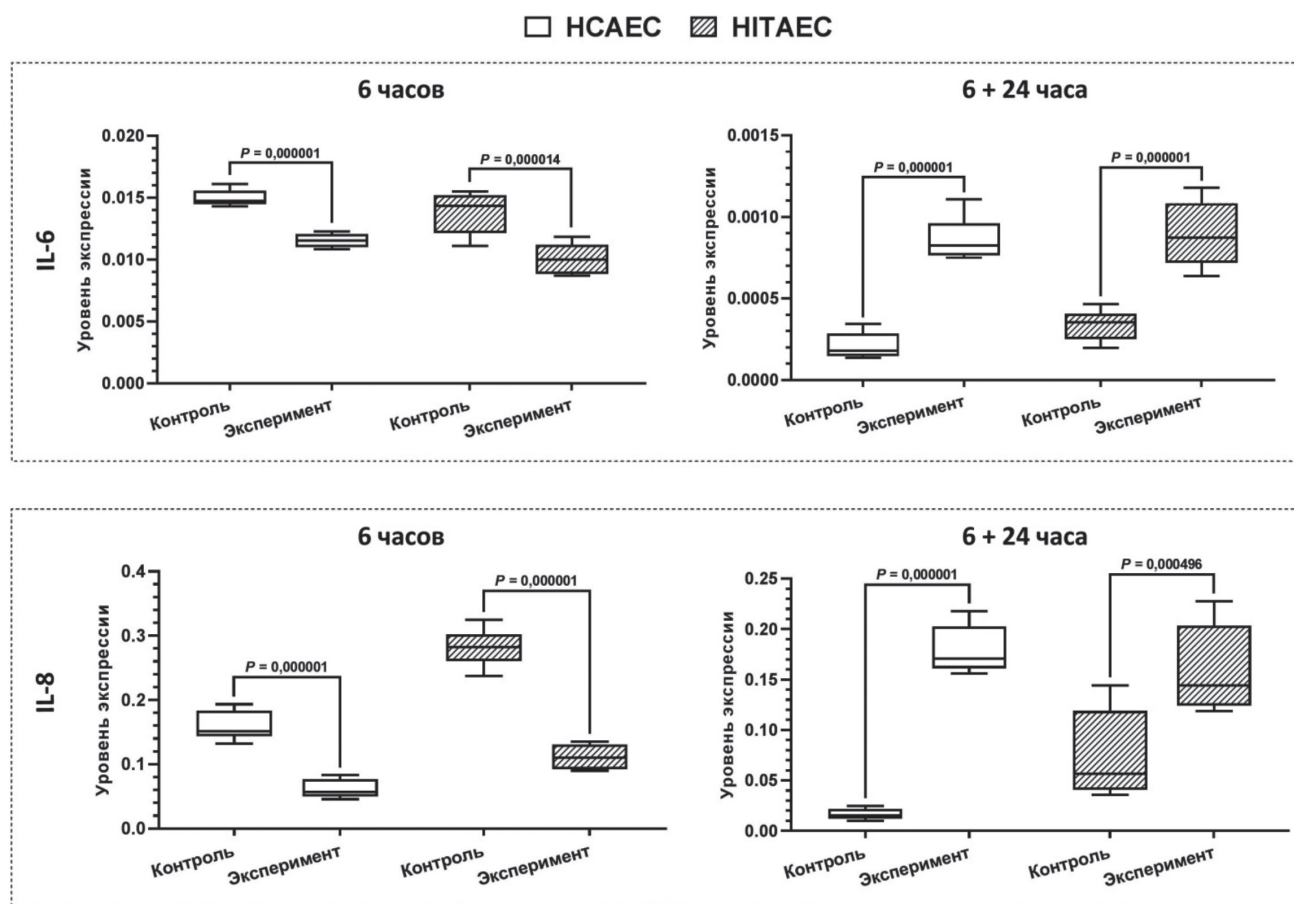


Рис. 3. Генная экспрессия проатеросклеротических цитокинов в клеточных культурах в зависимости от времени культивирования.

Примечание: границы «ящика» – первый и третий квартили, линия посередине – медиана, концы «усов» – минимальное и максимальное наблюдаемое значение по выборке.

ствия на ДНК [20] с дифференциальной секрецией и генной экспрессией проатеросклеротических цитокинов. Это свидетельствует о формировании эндотелиоцитами проатеросклеротического профиля в ответ на мутагенную нагрузку. Полученные нами результаты согласуются с ранее установленными данными о том, что повреждения ДНК (в частности, двойные разрывы, вызванные, в том числе, и алкилирующими агентами), сопровождающиеся генотоксическим стрессом, ассоциированы с активацией сигнального пути NF- κ B, играющего роль в воспалительном ответе [21]. С другой стороны показано, что кратковременная (не более 10 минут) экспозиция клеток ММС может оказывать влияние на конкретные сигнальные пути (в частности, MAPK-путь), которое выражается в повышении экспрессии провоспалительных цитокинов [22], что не исключает анеугенных и кластогенных эффектов данного мутагена. Более того, представленные нами результаты о менее выраженном воспалительном ответе клеток НІТАЕС на мутагенное воздействие согласуются с данными о том, что внутренняя грудная артерия в меньшей степени подвержена развитию атеросклероза, чем коронарная артерия. Первоначальное снижение секреции и генной экспрессии проатеросклеротических цитокинов в экспонированных ММС культурах может носить компенсаторный характер в ответ на действие мутагена, который воспринимается клеткой как стрессовый фактор. Кроме того, ММС может непосредственно воздействовать на структуру РНК, ускоряя ее деградацию. После элиминирования мутагена из культуры в течение митотического цикла происходит реализация повреждений ДНК, образовавшихся во время экспозиции, в провоспалительный и проатеросклеротический фенотип.

Таким образом, в ходе проведенного исследования впервые получены данные о мутаген-индуцированном изменении секреции и генной экспрессии проатеросклеротических цитокинов IL-6 и IL-8 в культурах первичных эндотелиальных клеток различных типов артерий, культивируемых в условиях генотоксической нагрузки.

Литература

- GBD 2017 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 282 causes of death, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018; 392: 1736–1788. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32203-7.
- Кутихин А.Г., Синицкий М.Ю., Понасенко А.В. Роль мутагенеза в развитии атеросклероза. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний* 2017; 6: 92–101. doi: 10.17802/2306-1278-2017-1-92-101.
- Weakley S.M., Jiang J., Kougiass P., Lin P.H., Yao Q., Brunicardi F.C. et. al. Role of somatic mutations in vascular disease formation. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2010; 10: 173–185. doi: 10.1586/erm.10.1.
- Nair J., De Flora S., Izzotti A., Bartsch H. Lipid peroxidation-derived etheno-DNA adducts in human atherosclerotic lesions. *Mutat. Res.* 2007; 621: 95–105. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2007.02.013.
- Pulliero A., Godschalk R., Andreassi M.G., Curfs D., Van Schooten F.J., Izzotti A. Environmental carcinogenesis and mutational pathways in atherosclerosis. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2015; 218: 293–312. doi: 10.1016/j.ijheh.2015.01.007.
- Lee Y.J., Park S.J., Ciccone S.L., Kim C.R., Lee S.H. An in vivo analysis of MMC-induced DNA damage and its repair. *Carcinogenesis* 2006; 27: 446–453. doi: 10.1093/carcin/bgi254.
- Caulfield J.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. Nitric oxide-induced interstrand cross-links in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 2003; 16: 571–574. doi: 10.1021/tx020117w.
- Stone M.P., Cho Y.J., Huang H., Kim H.Y., Kozekov I.D., Kozekova A. et. al. Interstrand DNA cross-links induced by alpha, beta-unsaturated aldehydes derived from lipid peroxidation and environmental sources. *Acc. Chem. Res.* 2008; 41: 793–804. doi: 10.1021/ar700246x.
- Cadet J., Davies K.J.A., Medeiros M.H., Mascio P.D., Wagner J.R. Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA. *Free Radic. Biol. Med.* 2017; 107: 13–34. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.049.
- Rink S.M., Lipman R., Alley S.C., Hopkins P.B., Tomasz M. Bending of DNA by the mitomycin C-induced, GpG intrastrand cross-link. *Chem. Res. Toxicol.* 1996; 9: 382–389. doi: 10.1021/tx950156q.
- Hartman J., Frishman W.H. 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.* 2014; 22: 147–151. doi: 10.1097/CRD.0000000000000021.
- Apostolakis S., Vogiatzi K., Amanatidou V., Spandidos D.A. Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 2009; 84: 353–360. doi: 10.1093/cvr/cvp241.
- Aboyans V., Lacroix P., Criqui M.H. Large and small vessels atherosclerosis: similarities and differences. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2007; 50: 112–125. doi: 10.1016/j.pcad.2007.04.001.
- Rosefort C., Fauth E., Zankl H. Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis* 2004; 19: 277–284. doi: 10.1093/mutage/geh028.
- OECD. Guidelines for the testing of chemicals no. 487: in vitro mammalian cell micronucleus test (Mnvt). OECD: Paris, France, 2010.
- Gu L., Okada Y., Clinton S.K., Gerard C., Sukhova G.K., Libby P. et. al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol. Cell* 1998; 2: 275–281. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80139-2.
- Harris T.B., Ferrucci L., Tracy R.P., Corti M.C., Wacholder S., Ettinger W.H. et. al. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am. J. Med.* 1999; 106: 506–512. doi: 10.1016/S0002-9343(99)00066-2.
- Romano M., Sironi M., Toniatti C., Polentarutti N., Fruscella P., Ghezzi P. et. al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997; 6: 315–325. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80334-9.
- Weber C., Schober A., Zernecke A. Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: 1997–2008. doi: 10.1161/01.ATV.0000142812.03840.6f.
- Синицкий М.Ю., Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Асанов М.А., Понасенко А.В. Оценка цитотоксических и генотоксических эффектов митомидина С в культурах эндотелиальных клеток человека. *Гены и клетки* 2020; 15: 45–49. doi: 10.23868/202003006.

21. Sabatel H., Pirlot C., Piette J., Habraken Y. Importance of PIKKs in NF- κ B activation by genotoxic stress. *Biochem. Pharmacol.* 2011; 82: 1371-1383. doi: 10.1016/j.bcp.2011.07.105.
 22. Chou S.F., Chang S.W., Chuang J.L. Mitomycin C upregulates IL-8 and MCP-1 chemokine expression via mitogen-activated protein kinases in corneal fibroblasts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007; 48: 2009-2016. doi: 10.1167/iops.06-0835.
- ### References
1. GBD 2017 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 282 causes of death, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018; 392: 1736-1788. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32203-7.
 2. Kutikhin A.G., Sinitsky M.Y., Ponasenko A.V. Rol' mutageneza v razviti ateroskleroza. [The role of mutagenesis in atherosclerosis]. *Kompleksnye problemy serdechno-sosudistyh zabolevanij [Complex Issues of Cardiovascular Diseases]* 2017; 6: 92-101. (In Russ.).
 3. Weakley S.M., Jiang J., Kougias P., Lin P.H., Yao Q., Brunicardi F.C. et. al. Role of somatic mutations in vascular disease formation. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2010; 10: 173-185. doi: 10.1586/erm.10.1.
 4. Nair J., De Flora S., Izzotti A., Bartsch H. Lipid peroxidation-derived etheno-DNA adducts in human atherosclerotic lesions. *Mutat. Res.* 2007; 621: 95-105. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2007.02.013.
 5. Pulliero A., Godschalk R., Andreassi M.G., Curfs D., Van Schooten F.J., Izzotti A. Environmental carcinogenesis and mutational pathways in atherosclerosis. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2015; 218: 293-312. doi: 10.1016/j.ijheh.2015.01.007.
 6. Lee Y.J., Park S.J., Ciccone S.L., Kim C.R., Lee S.H. An in vivo analysis of MMC-induced DNA damage and its repair. *Carcinogenesis* 2006; 27: 446-453. doi: 10.1093/carcin/bgi254.
 7. Caulfield J.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. Nitric oxide-induced interstrand cross-links in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 2003; 16: 571-574. doi: 10.1021/tx020117w.
 8. Stone M.P., Cho Y.J., Huang H., Kim H.Y., Kozekov I.D., Kozekova A. et. al. Interstrand DNA cross-links induced by alpha, beta-unsaturated aldehydes derived from lipid peroxidation and environmental sources. *Acc. Chem. Res.* 2008; 41: 793-804. doi: 10.1021/ar700246x.
 9. Cadet J., Davies K.J.A., Medeiros M.H., Mascio P.D., Wagner J.R. Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA. *Free Radic. Biol. Med.* 2017; 107: 13-34. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.049.
 10. Rink S.M., Lipman R., Alley S.C., Hopkins P.B., Tomasz M. Binding of DNA by the mitomycin C-induced, GpG intrastrand cross-link. *Chem. Res. Toxicol.* 1996; 9: 382-389. doi: 10.1021/tx950156q.
 11. Hartman J., Frishman W.H. 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.* 2014; 22: 147-151. doi: 10.1097/CRD.000000000000021.
 12. Apostolakis S., Vogiatzi K., Amanatidou V., Spandidos D.A. Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 2009; 84: 353-360. doi: 10.1093/cvr/cvp241.
 13. Aboyans V., Lacroix P., Criqui M.H. Large and small vessels atherosclerosis: similarities and differences. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2007; 50: 112-125. doi: 10.1016/j.pcad.2007.04.001.
 14. Rosefort C., Fauth E., Zankl H. Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis* 2004; 19: 277-284. doi: 10.1093/mutage/geh028.
 15. OECD. Guidelines for the testing of chemicals no. 487: in vitro mammalian cell micronucleus test (Mnvt). OECD: Paris, France, 2010.
 16. Gu L., Okada Y., Clinton S.K., Gerard C., Sukhova G.K., Libby P. et. al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol. Cell* 1998; 2: 275-281. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80139-2.
 17. Harris T.B., Ferrucci L., Tracy R.P., Corti M.C., Wacholder S., Ettinger W.H. et. al. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am. J. Med.* 1999; 106: 506-512. doi: 10.1016/S0002-9343(99)00066-2.
 18. Romano M., Sironi M., Toniatti C., Polentarutti N., Fruscella P., Ghezzi P. et. al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997; 6: 315-325. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80334-9.
 19. Weber C., Schober A., Zernecke A. Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: 1997-2008. doi: 10.1161/01.ATV.0000142812.03840.6f.
 20. Sinitsky M.Y., Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Asanov M.A., Ponasenko A.V. Ocenka citotoksicheskikh i genotoksicheskikh jeffektov mitomicina S v kul'turakh jendotelial'nykh kletok cheloveka. [Cytotoxic and genotoxic effects of mitomycin C toward human endothelial cells]. *Geny i kletki [Genes and Cells]* 2020; 15: 45-49. (In Russ.).
 21. Sabatel H., Pirlot C., Piette J., Habraken Y. Importance of PIKKs in NF- κ B activation by genotoxic stress. *Biochem. Pharmacol.* 2011; 82: 1371-1383. doi: 10.1016/j.bcp.2011.07.105.
 22. Chou S.F., Chang S.W., Chuang J.L. Mitomycin C upregulates IL-8 and MCP-1 chemokine expression via mitogen-activated protein kinases in corneal fibroblasts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007; 48: 2009-2016. doi: 10.1167/iops.06-0835.