



ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТКАХ КОРОНАРНОЙ АРТЕРИИ, ЭКСПОНИРОВАННЫХ МУТАГЕНОМ АЛКИЛИРУЮЩЕГО МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ

М.Ю. Синицкий, А.В. Синицкая, Д.К. Шишкова, М.В. Хуторная, М.А. Асанов, А.В. Понасенко

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Сосновский бульвар, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Основные положения

- Шестичасовая экспозиция гладкомышечных клеток коронарной артерии человека алкилирующим мутагеном митомицином С не приводит к изменению уровня экспрессии генов *IL6* и *IL8*.
- Через сутки после удаления мутагена из культуральной среды в клетках наблюдается значительное снижение экспрессии изученных цитокинов.
- Не обнаружено значимых изменений концентрации *IL6* и *IL8* в культуральной среде гладкомышечных клеток, культивируемых в условиях генотоксической нагрузки.

Актуальность	Известно, что повреждение ДНК гладкомышечных клеток может быть триггером их клональной экспансии и трансформации в пенистые клетки. Таким образом, изучение молекулярно-генетических механизмов ответа гладкомышечных клеток сосудов на генотоксическое воздействие представляется важным и актуальным в контексте углубленного понимания механизмов атерогенеза.
Цель	Изучить характер изменения уровня мРНК и концентрации провоспалительных цитокинов <i>IL6</i> и <i>IL8</i> в гладкомышечных клетках коронарной артерии человека, культивируемых в условиях генотоксической нагрузки.
Материалы и методы	Уровень генной экспрессии изучаемых цитокинов в гладкомышечных клетках коронарной артерии человека оценивали с помощью количественной полимеразной цепной реакции в двух временных точках – непосредственно после 6 ч экспозиции клеток митомицином С (точка 1) и после 6 ч экспозиции мутагеном с последующими 24 ч культивирования клеток в чистой культуральной среде (точка 2). Контролем служили гладкомышечные клетки, культивируемые по вышеуказанной схеме без генотоксической нагрузки. В качестве референсных генов использовали <i>HPRT1</i> , <i>GAPDH</i> и <i>B2M</i> . Уровень экспрессии генов интереса рассчитывали по методу ΔC_t . Концентрацию <i>IL6</i> и <i>IL8</i> в культуральной среде определяли с помощью иммуноферментного анализа в точках 1 и 2. Статистический анализ полученных результатов проводили в программе GraphPad Prism 9.
Результаты	Непосредственно после мутагенного воздействия (точка 1) не выявлено изменения уровня экспрессии генов <i>IL6</i> и <i>IL8</i> в гладкомышечных клетках, экспонированных митомицином С, по сравнению с неэкспонированным контролем. После удаления из культур мутагена в экспериментальной группе отмечено снижение уровня мРНК генов <i>IL6</i> и <i>IL8</i> по сравнению с контролем (кратность изменения экспрессии составила 0,36 и 0,67 соответственно). При этом достоверных различий концентрации изученных цитокинов в культуральной среде гладкомышечных клеток, экспонированных митомицином С, по сравнению с контролем не выявлено.
Заключение	Генотоксический стресс в гладкомышечных клетках коронарной артерии человека, вызванный алкилирующим мутагеном митомицином С, приводит к изменению профиля генной экспрессии, но не концентрации провоспалительных цитокинов <i>IL6</i> и <i>IL8</i> . Таким образом, воздействие митомицина С на гладкомышечные клетки не приводит к формированию ими провоспалительного фенотипа.
Ключевые слова	Мутагенез • Атерогенез • Провоспалительные цитокины • Воспаление • Гладкомышечные клетки

Поступила в редакцию: 25.07.2022; поступила после доработки: 04.08.2022; принята к печати: 31.09.2022

Для корреспонденции: Максим Юрьевич Синицкий, max-sinitsky@rambler.ru; адрес: Сосновский бульвар, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Corresponding author: Maxim Yu. Sinitsky, max-sinitsky@rambler.ru; address: 6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

GENE EXPRESSION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN HUMAN CORONARY ARTERY SMOOTH MUSCLE CELLS EXPOSED TO ALKYLATING MUTAGEN

M.Yu. Sinitsky, A.V. Sinitskaya, D.K. Shishkova, M.V. Khutornaya, M.A. Asanov, A.V. Ponasenko

Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", 6, Sosnoviy Blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

Highlights

- Six-hour exposure of human coronary artery smooth muscle cells to the alkylating mutagen mitomycin C leads to no changes in the expression of *IL6* and *IL8* genes.
- Removal of mutagen from cell culture medium lead to a significant decrease in the expression of the studied cytokines.
- No significant changes were found in the concentration of IL6 and IL8 in the culture medium of smooth muscle cells cultivated under genotoxic conditions.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ

Background	It is known that DNA damage in smooth muscle cells can trigger their clonal expansion and transformation into foam cells. Thus, the study of the molecular genetic mechanisms of the vascular smooth muscle cells response to genotoxic exposure is important and relevant in the context of an in-depth understanding of atherogenesis.
Aim	To study mRNA level and concentration of proinflammatory cytokines IL6 and IL8 in the human coronary artery smooth muscle cells exposed to alkylating mutagen.
Methods	Gene expression signature of studied cytokines in the human coronary artery smooth muscle cells was accessed by quantitative polymerase chain reaction in the two timepoints – immediately after six-hour exposure to mitomycin C (point 1) and after six-hour exposure to mitomycin C followed by 24 hours of cells being cultivated on mitomycin C-free cell growth medium (point 2). Smooth muscle cells cultured according to the above scheme without genotoxin were used as controls. <i>HPRT1</i> , <i>GAPDH</i> and <i>B2M</i> were used as the reference genes. Gene expression level was calculated by ΔC_t method. IL6 and IL8 concentration was evaluated in the culture media in points 1 and 2 by enzyme-linked immunosorbent assay. Statistical analysis was performed in GraphPad Prism 9 software.
Results	Immediately after mutagenic exposure (point 1) we discovered no significant changes in the expression level of <i>IL6</i> and <i>IL8</i> in the mitomycin C exposed smooth muscle cells compared to controls. Removal of mutagen increased expression of <i>IL6</i> and <i>IL8</i> in the experimental group (0,36- and 0,67-fold, respectively). At the same time, we discovered no significant differences in the studied cytokines concentration in the culture medium of mutagen-exposed cells compared to the nonexposed controls.
Conclusion	Genotoxic stress in human coronary artery smooth muscle cells exposed to alkylating mutagen (mitomycin C) leads to differential expression but not secretion of proinflammatory cytokines IL6 and IL8. Thus, exposure of smooth muscle cells to mitomycin C do not trigger their proinflammatory phenotype.
Keywords	Mutagenesis • Atherogenesis • Proinflammatory cytokines • Inflammation • Smooth muscle cells

Received: 25.07.2022; received in revised form: 04.08.2022; accepted: 31.09.2022

Список сокращений

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота	РНК – рибонуклеиновая кислота
кДНК – комплиментарная ДНК	HCASMC – гладкомышечные клетки коронарной артерии человека (human coronary artery smooth muscle cells)
ММС – митоминин С	
ПЦР – полимеразная цепная реакция	

Введение

Атеросклероз – мультифакторное заболевание, в основе которого лежит комплексный воспалительный процесс. В патогенезе атеросклероза задействованы различные клетки (эндотелиальные, гладкомышечные, лимфоциты и макрофаги), а также компоненты внеклеточного матрикса (внеклеточные липиды, коллаген и другие). Возникновению атеросклеротического поражения способствуют различные факторы роста и провоспалительные цитокины, являющиеся триггером аккумуляции иммунных клеток и компонентов внеклеточного матрикса в стенке кровеносного сосуда [1], что приводит к образованию атеросклеротической бляшки, состоящей из липидного некротизированного ядра, покрытого фиброзной покрывкой с большим количеством гладкомышечных клеток [2].

Существуют свидетельства того, что гладкомышечные клетки, входящие в состав атеросклеротической бляшки, по своей природе клональны, а повреждение дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) данных клеток служит триггером их миграции из медиа в интиму, приобретению способности к фагоцитозу и, как следствие, трансформации в пенетрирующие клетки [3]. Более того, генотоксический стресс, вызванный мутагенным воздействием на организм человека, выступает одним из факторов риска развития атеросклероза [4]. Так, гладкомышечные клетки атеросклеротической бляшки характеризуются повышенным уровнем ароматических ДНК-аддуктов (свидетельствующих о выраженном генотоксическом стрессе) по сравнению со здоровыми тканями [5, 6].

С учетом высокого уровня заболеваемости и смертности, вызванной атеросклерозом [7], а также повышенной генотоксической нагрузки на население (связанной как с естественными, так и антропогенными мутагенными факторами) понимание молекулярно-генетических механизмов атерогенеза, а также роли генотоксического стресса в данном процессе чрезвычайно важно для современной медицины и сосудистой биологии. Таким образом, целью работы явилось изучение уровня генной экспрессии и секреции провоспалительных цитокинов IL6 и IL8 в гладкомышечных клетках коронарной артерии человека, *in vitro* экспонируемых мутагеном алкилирующего механизма действия митомицином С (ММС).

Материалы и методы

Работа с клеточными культурами

Материалом исследования послужили коммерческие культуры первичных гладкомышечных клеток коронарной артерии человека (human coronary artery smooth muscle cells, HCASMC; Cell Applications, США). Все работы с клеточными культурами проводили в асептических условиях. Клетки культивировали в условиях повышенной влажности, 5% содержания CO₂ и при температуре

37 °С в среде для роста клеток Human SMC Growth Medium (Cell Applications, США) до достижения 80% конfluenceности, после чего пересевали в восемь 6-луночных культуральных планшетов, содержащих по 2 мл среды для роста клеток в каждой лунке, и культивировали еще сутки. После окончания культивирования старую среду для роста клеток удаляли и добавляли в каждую лунку четырех планшетов 2 мл свежей среды, содержащей 500 нг/мл алкилирующего мутагена ММС (AppliChem, Испания) (экспериментальная группа). В оставшиеся четыре планшета добавляли 2 мл среды с 0,9% раствором NaCl (контрольная группа). Экспериментальные и контрольные планшеты культивировали в стандартных условиях в течение 6 ч, после чего два экспериментальных и два контрольных планшета выводили из эксперимента (точка 1), а в остальных четырех меняли культуральную среду на свежую и культивировали еще сутки, после чего также выводили из эксперимента (точка 2). Общий дизайн исследования представлен на *рисунке*.

Выбор концентрации ММС, использованной в эксперименте, а также времени культивирования был основан на текущих рекомендациях и данных экспериментов по моделированию мутагенеза *in vitro* [8, 9].

Оценка уровня генной экспрессии цитокинов

Экспрессия генов *IL6* и *IL8* оценена в HCASMC в точках 1 и 2. Культуральную среду из каждой лунки культурального планшета аликвотировали по 500 мкл и замораживали (в дальнейшем данные образцы использованы для оценки концентрации провоспалительных цитокинов в клеточных культурах), клетки двукратно отмывали холодным фосфатно-солевым буфером и лизировали в 1 мл реагента QIAzol (Qiagen, Германия). Выделение рибонуклеиновой кислоты (РНК) из клеток и ее очистка от геномной ДНК проведены с помощью коммерческих наборов RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen, Германия). Выделенную РНК хранили при температуре –80 °С.

На основе выделенной РНК с помощью коммерческих наборов High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США) синтезировали молекулу комплиментарной ДНК (кДНК), которую хранили при температуре –20 °С до начала дальнейших экспериментов. Количество и качество РНК и кДНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, США).

Экспрессию генов *IL6* и *IL8* измеряли с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с использованием меток TaqMan™ Gene Expression Assay (Applied Biosystems, США) Hs00174131_m1 (*IL-6*) и Hs00174103_m1 (*IL-8*) на амплификаторе ViiA 7 (Applied Biosystems, США). Эксперимент по оценке генной экспрессии

выполнен в строгом соответствии с существующими стандартами [10]. ПЦР проводили в 96-луночном планшете, содержащем помимо анализируемых образцов пять стандартов с двукратным разведением (необходимых для оценки качества ПЦР) и отрицательный контроль. Каждый образец, стандарт и отрицательный контроль анализировали в трех технических повторах. В каждую лунку 96-луночного планшета вносили по 20 мкл реакционной смеси, включавшей 10 мкл мастер-микса TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, США), 1 мкл соответствующей метки TaqMan™ Gene Expression Assay (Applied Biosystems, США) и 9 мкл кДНК (либо деионизированной воды в случае с отрицательным контролем). ПЦР проводили по следующей программе: 2 минуты при 50 °С (1 цикл), 10 минут при 95 °С (1 цикл), 15 секунд при 95 °С с последующими 60 секундами при 60 °С (40 циклов). В качестве референсных использованы гены *HPRT1*, *GAPDH* и *B2M* (Applied Biosystems, США). Уровень экспрессии генов *IL6* и *IL8* рассчитывали по методу ΔC_t (уровень экспрессии гена интереса) = 2^{C_t} [среднее геометрическое референсных генов] - C_t [ген интереса]) и выражали в виде условных единиц (у.е.).

Оценка концентрации цитокинов в культуральной среде

Концентрация цитокинов *IL6* и *IL8* определена в собранной на этапе подготовки образцов к оценке генной экспрессии культуральной среде с помощью иммуоферментного анализа с использованием коммерческих наборов *IL-6 Human SimpleStep ELISA Kit* (Abcam, Англия) и *IL-8 Human ELISA Kit* (Abcam, Англия) по протоколу производителя. Оптическую плотность образцов измеряли с

помощью микропланшетного спектрофотометра Multiskan Sky (Thermo Scientific, США) и переводили в концентрацию, выражаемую в пг/мл.

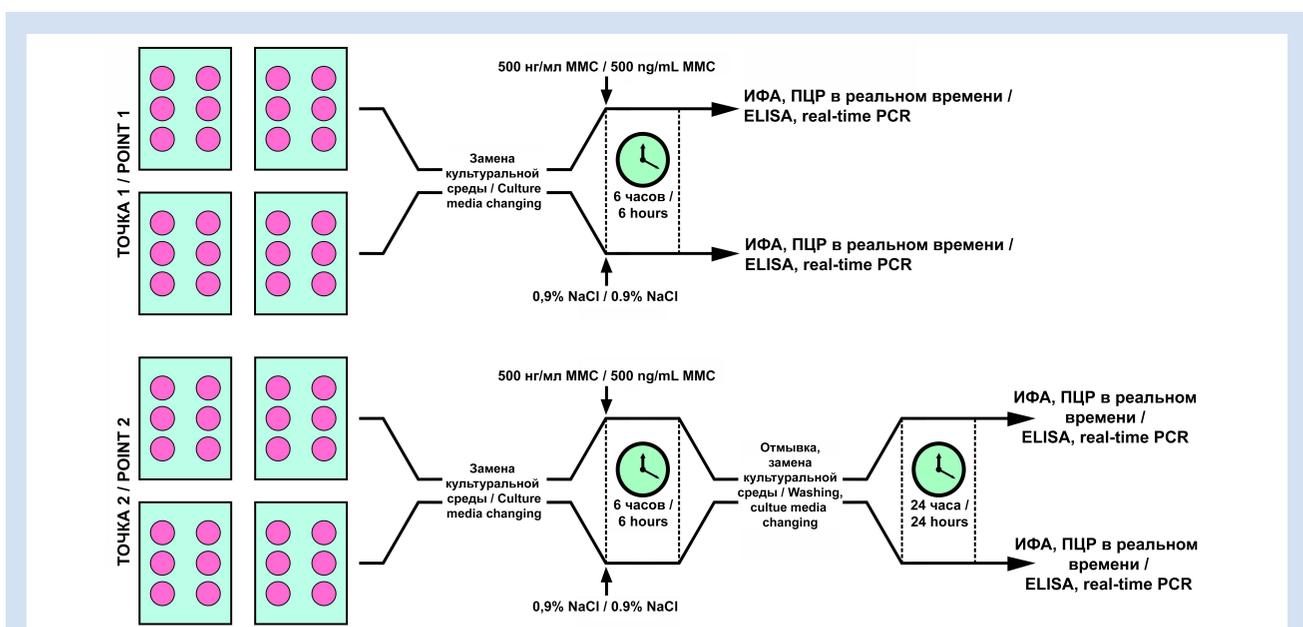
Статистический анализ

Статистическая обработка результатов исследования выполнена в программе GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, США). Для количественных показателей рассчитывали медиану (*m*) и межквартильный размах (IQR), сравнение двух независимых групп проводили с помощью U-критерия Манна – Уитни, ассоциации между количественными показателями анализировали с помощью ранговой корреляции Спирмена. Различия между группами считали статистически значимыми при значения $p < 0,05$.

Результаты

В эксперименте из HCASMC удалось выделить от 254,1 до 430,8 нг/мкл РНК с коэффициентами $A_{260/280}$ и $A_{260/230}$ более 2,05 и 1,82 соответственно (что свидетельствует об отсутствии контаминации образцов РНК белковыми и органическими соединениями). Результаты ПЦР проанализированы в программе QuantStudio™ Real-Time PCR Software v.1.3 (Applied Biosystems, США). Эффективность реакций амплификации составила 91–99%, значение R^2 находилось в диапазоне от 0,990 до 0,999, амплификация в отрицательном контроле отсутствовала. Все это подтверждает высокую специфичность и достоверность полученных данных об уровне генной экспрессии цитокинов.

Анализ генной экспрессии *IL6* и *IL8* показал, что непосредственно после генотоксического воздействия (точка 1) в экспонированных MMC HCASMC не обнаружено изменения уровня мРНК изученных



Дизайн исследования

Примечание: ИФА – иммуоферментный анализ; MMC – митомицин C; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Study design

Note: ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay; MMC – mitomycin C; PCR – polymerase chain reaction.

цитокинов в сравнении с контролем. После элиминирования из культур мутагена с последующими сутками культивирования клеток в чистой культуральной среде в экспериментальных культурах отмечено значительное снижение уровня экспрессии генов *IL6* и *IL8* относительно клеток, культивированных в отсутствие генотоксической нагрузки (кратность изменения составила 0,36 и 0,67 соответственно, $p < 0,001$) (табл. 1).

Одновременно с этим концентрация изученных цитокинов в культуральной среде не различалась в контрольной и экспериментальной группах в обеих временных точках (табл. 2).

Кроме того, нами не обнаружено корреляции между уровнем генной экспрессии и концентрацией изученных цитокинов в культуральной среде.

Обсуждение

Еще в конце прошлого века высказано предположение о том, что к образованию атеросклеротических бляшек могут приводить генотоксический стресс и соматические мутации [11], накопление которых является не только естественным физиологическим процессом, связанным с эффективностью функционирования систем репарации ДНК, но и следствием действия на организм человека различных генотоксических факторов [12]. Такие факторы могут иметь как эндогенную (бифункциональные альдегиды – продукты перекисного окисления липидов и биосинтеза простагландинов; азотистая кислота – побочный продукт метаболизма нитритов и реакции воды и оксида азота; свободные радикалы), так и экзогенную (компоненты пищевых добавок, пестицидов, табачного дыма, выхлопных газов и выбросов промышленных пред-

приятий; ионизирующая радиация) природу [13], при этом вклад последних в формирование генотоксического стресса постоянно увеличивается в связи с развитием промышленности и ухудшением экологической обстановки. Все вышеперечисленные факторы посредством реакции алкилирования вызывают образование поперечных сшивок молекулы ДНК, что приводит к нарушению процессов репликации и транскрипции и в конечном итоге к гибели клеток в результате апоптоза [14]. Для моделирования подобных процессов в экспериментах *in vitro* наиболее часто используют алкилирующий мутаген ММС, обладающий рядом преимуществ, среди которых высокая растворимость в воде и физиологическом растворе, способность долго сохранять стабильность и мутагенную активность в клеточных культурах при 37 °С.

Ранее в наших исследованиях установлено, что генотоксический стресс, вызванный воздействием на клеточные культуры эндотелиальных клеток ММС, приводит к увеличению экспрессии провоспалительных цитокинов [15] и молекул, выступающих маркерами эндотелиальной дисфункции [16], и, таким образом, является одним из факторов риска развития атеросклероза. Вместе с тем для более полного понимания роли генотоксического стресса в атерогенезе необходимо изучить особенности ответа на мутагенное воздействие других клеток, вовлеченных в данный процесс, в том числе гладкомышечных.

Известно, что провоспалительные сигналы, индуцированные ангиотензином II посредством активации рецептора AT1R, экспрессируемого в гладкомышечных клетках сосудов, активируют связывание с ними моноцитов, что указывает на связь между гладкомышечными клетками, воспалением

Таблица 1. Относительная экспрессия генов цитокинов в гладкомышечных клетках коронарной артерии человека (у.е., $m \pm IQR$)
Table 1. Relative gene expression of cytokines in human coronary artery smooth muscle cells (a.u., $m \pm IQR$)

Ген / Gene	Точка 1 / Point 1			Точка 2 / Point 2		
	Контроль / Control	Эксперимент / Experiment	Кратность изменения относительно контроля / Fold-change compared to control	Контроль / Control	Эксперимент / Experiment	Кратность изменения относительно контроля / Fold-change compared to control
<i>IL6</i>	0,33±0,16	0,28±0,11	0,85	0,47±0,22	0,17±0,08*	0,36
<i>IL8</i>	4,35±1,35	4,25±1,19	0,98	3,45±0,41	2,32±1,35*	0,67

Примечание: * достоверные различия по сравнению с контролем.
Note: * significant differences in comparison with control.

Таблица 2. Концентрация цитокинов в культурах гладкомышечных клеток коронарной артерии человека (пг/мл, $m \pm IQR$)
Table 2. Cytokine concentration in human coronary artery smooth muscle cells culture medium (pg/mL, $m \pm IQR$)

Цитокин / Cytokine	Точка 1 / Point 1			Точка 2 / Point 2		
	Контроль / Control	Эксперимент / Experiment	Кратность изменения относительно контроля / Fold-change compared to control	Контроль / Control	Эксперимент / Experiment	Кратность изменения относительно контроля / Fold-change compared to control
<i>IL6</i>	37,01±19,36	36,45±10,51	0,99	485,35±218,90	431,60±284,45	0,89
<i>IL8</i>	115,25±39,30	111,10±39,40	0,96	806,30±221,50	868,80±549,20	1,08

и атеросклерозом [17, 18]. Эта связь подтверждается данными о том, что стимуляция Toll-подобных рецепторов (в частности TLR2 и TLR4), участвующих во врожденном иммунном ответе, различными агентами, среди которых белок теплового шока HSP60 [19] и липополисахариды, приводит к активации фосфорилирования внеклеточной киназы ERK1/2, индуцирует высвобождение моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1) и интерлейкина 6, а также увеличивает экспрессию интерлейкина 1 [20]. Установлено, что провоспалительные цитокины могут продуцироваться гладкомышечными клетками TLR2-Nox1-зависимым образом, что приводит к увеличению адгезии моноцитов к эндотелиальным клеткам и их трансэндотелиальной миграции [21]. В свою очередь интерлейкин 1 может стимулировать синтез гладкомышечными клетками IL6 и IL8 [22]. В обычных условиях IL6 синтезируется гладкомышечными клетками в малых количествах, однако его секреция увеличивается при обработке клеточных культур эндотоксином, фактором некроза опухолей TNF α и IL1. IL6 благодаря способности активировать синтез белков острой фазы воспаления, пролиферацию и дифференциацию лимфоцитов, стимулирование экспрессии молекулы клеточной адгезии ICAM1 на эндотелиальных клетках считается одним из основных проатеросклеротических цитокинов [23]. IL8 представляет собой хемокин, активно экспрессирующийся макрофагами, эндотелиальными и гладкомышечными клетками. Он также относится к проатеросклеротическим цитокинам за счет способности стимулировать адгезию моноцитов к эндотелиальным клеткам [24]. Таким образом, гладкомышечные клетки являются важным звеном регуляции воспаления в сосудистой ткани.

В нашем исследовании установлено, что генотоксический стресс не приводит к развитию воспалительного ответа в культурах гладкомышечных клеток в отличие от эндотелиоцитов [15]. Более того, определено, что экспозиция клеточных культур ММС сначала не оказывает никакого влияния на экспрессию генов *IL6* и *IL8*, а затем, через сутки после удаления мутагена из культур, напротив, наблюдается значительное уменьшение уровня генной экспрессии изученных провоспалительных цитокинов. Данное снижение может носить компенсаторный характер и быть функциональной особенностью реагирования гладкомышечных

клеток на генотоксический стресс. В то же время ММС может воздействовать непосредственно на РНК, приводя к ее деградации, что в итоге проявляется снижением количества соответствующих мРНК. Однако следует заметить, что все изменения в профиле генной экспрессии гладкомышечных клеток, культивируемых в условиях генотоксической нагрузки, нивелируются на фенотипическом уровне, что выражается в отсутствии изменения количества синтезируемых клетками в культуральную среду цитокинов IL6 и IL8. Данные результаты свидетельствуют о наличии эпигенетических и посттрансляционных механизмов регуляции ответа гладкомышечных клеток на генотоксический стресс, вызванный алкилирующим мутагеном ММС, что требует дополнительного изучения.

Заключение

Установлено, что генотоксический стресс, вызванный мутагеном алкилирующего механизма действия ММС, не приводит к развитию воспалительного ответа в культурах первичных гладкомышечных клеток коронарной артерии человека. Таким образом, гладкомышечные клетки, в отличие от эндотелиоцитов, не вовлечены в процесс мутаген-индуцированного атерогенеза.

Конфликт интересов

М.Ю. Сеницкий заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.В. Сеницкая заявляет об отсутствии конфликта интересов. Д.К. Шишкова заявляет об отсутствии конфликта интересов. М.В. Хуторная заявляет об отсутствии конфликта интересов. М.А. Асанов заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.В. Понасенко заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0001 «Молекулярные, клеточные и биомеханические механизмы патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний в разработке новых методов лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы на основе персонифицированной фармакотерапии, внедрения малоинвазивных медицинских изделий, биоматериалов и тканеинженерных имплантатов».

Информация об авторах

Сеницкий Максим Юрьевич, кандидат биологических наук старший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-4824-2418

Author Information Form

Sinitsky Maxim Yu., PhD, Senior Researcher at the Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution "Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4824-2418

Синицкая Анна Викторовна, кандидат биологических наук научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-4467-8732

Шишкова Дарья Кирилловна, кандидат биологических наук научный сотрудник лаборатории молекулярной, трансляционной и цифровой медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-1518-3888

Хуторная Мария Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-9714-4080

Асанов Максим Айдарович, младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-0747-2495

Понасенко Анастасия Валериевна, кандидат медицинских наук заведующая лабораторией геномной медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-3002-2863

Sinitzkaya Anna V., PhD, Researcher at the Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4467-8732

Shishkova Daria K., PhD, Researcher at the Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-1518-3888

Khutornaya Maria V., Junior Researcher at the Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-9714-4080

Asanov Maxim A., Junior Researcher at the Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-0747-2495

Ponassenko Anastasia V., PhD, Head of the Laboratory of Molecular, Translational and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-3002-2863

Вклад авторов в статью

СМЮ – вклад в концепцию и дизайн исследования, получение и анализ данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

САВ – получение данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ШДК – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ХМВ – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

АМА – получение данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ПАВ – вклад в концепцию и дизайн исследования, анализ данных исследования, корректировка статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Contribution Statement

SMYu – contribution to the concept and design of the study, data collection and analysis, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

SAV – data collection, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

ShDK – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

KhMV – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

AMA – data collection, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

PAV – contribution to the concept and design of the study, data analysis, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Libby P., Ridker P.M., Hansson G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473(7347):317-325. doi: 10.1038/nature10146.
2. Bentzon J.F., Otsuka F., Virmani R., Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*. 2014;114(12):1852-

1866. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302721.

3. Pulliero A., Godschalk R., Andreassi M.G., Curfs D., Van Schooten F.J., Izzotti A. Environmental carcinogens and mutational pathways in atherosclerosis. *Int J Hyg Environ Health*. 2015;218(3):293-312. doi: 10.1016/j.ijheh.2015.01.007.

4. Кутихин А.Г., Синицкий М.Ю., Понасенко А.В. Роль мутагенеза в развитии атеросклероза. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2017;(1):92-101. doi: 10.17802/2306-1278-2017-1-92-101.
5. Binková B., Smerhovský Z., Strejc P., Boubelík O., Stávková Z., Chvátalová I., Srám R.J. DNA-adducts and atherosclerosis: a study of accidental and sudden death males in the Czech Republic. *Mutat Res.* 2002;501(1-2):115-128. doi: 10.1016/s0027-5107(02)00019-2.
6. Nair J., De Flora S., Izzotti A., Bartsch H. Lipid peroxidation-derived etheno-DNA adducts in human atherosclerotic lesions. *Mutat Res.* 2007;621(1-2):95-105. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2007.02.013.
7. GBD 2017 Causes of Death Collaborators. 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.* 2018;392(10159):1736-1788. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32203-7.
8. Rosefort C., Fauth E., Zankl H. Micronuclei induced by aeneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis.* 2004;19(4):277-284. doi: 10.1093/mutage/geh028.
9. Lorge E., Thybaud V., Aardema M.J., Oliver J., Wakata A., Lorenzon G., Marzin D. SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutat Res.* 2006;607(1):13-36. doi: 10.1016/j.mrgentox.2006.04.006.
10. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611-622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.
11. Weakley S.M., Jiang J., Kougius P., Lin P.H., Yao Q., Brunicardi F.C., Gibbs R.A., Chen C. Role of somatic mutations in vascular disease formation. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010;10(2):173-185. doi: 10.1586/erm.10.1.
12. Kirsch-Volders M., Bonassi S., Knasmueller S., Holland N., Bolognesi C., Fenech M.F. Commentary: critical questions, misconceptions and a road map for improving the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for in vivo biomonitoring of human exposure to genotoxic chemicals-a HUMN project perspective. *Mutat Res.* 2014;759:49-58. doi: 10.1016/j.mrrev.2013.12.001.
13. 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. Interstrand DNA cross-links induced by alpha, beta-unsaturated aldehydes derived from lipid peroxidation and environmental sources. *Acc Chem Res.* 2008;41(7):793-804. doi: 10.1021/ar700246x.
14. 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(3):446-53. doi: 10.1093/carcin/bgi254.
15. Sinitsky M.Y., Kutikhin A.G., Tsepokina A.V., Shishkova D.K., Asanov M.A., Yuzhalin A.E., Minina V.I., Ponasenko A.V. Mitomycin C induced genotoxic stress in endothelial cells is associated with differential expression of proinflammatory cytokines. *Mutat Res.* 2020;858-860:503252. doi: 10.1016/j.mrgentox.2020.503252.
16. Синицкий М.Ю., Цепочкина А.В., Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Понасенко А.В. Профиль генной экспрессии в эндотелиальных клетках, культивируемых в присутствии митомицина С. *Биомедицинская химия.* 2021;67(2):130-136. doi: 10.18097/pbmc20216702130
17. Cai Q., Lanting L., Natarajan R. Growth factors induce monocyte binding to vascular smooth muscle cells: implications for monocyte retention in atherosclerosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287:707-714. doi: 10.1152/ajpcell.00170.2004.
18. Lim S., Park S. Role of vascular smooth muscle cell in the inflammation of atherosclerosis. *BMB Rep.* 2014;47(1):1-7. doi: 10.5483/bmbrep.2014.47.1.285.
19. Lee G.L., Chang Y.W., Wu J.Y., Wu M.L., Wu K.K., Yet S.F., Kuo C.C. TLR 2 induces vascular smooth muscle cell migration through cAMP response element-binding protein-mediated interleukin-6 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:2751-2760. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300302.
20. Yang X., Coriolan D., Murthy V., Schultz K., Golenbock D.T., Beasley D. Proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells: role of efficient Toll-like receptor 4 signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:1069-1076. doi: 10.1152/ajpheart.00143.2005.
21. Lee J.H., Joo J.H., Kim J., Lim H.J., Kim S., Curtiss L., Seong J.K., Cui W., Yabe-Nishimura C., Bae Y.S. Interaction of NADPH oxidase 1 with Toll-like receptor 2 induces migration of smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2013;99:483-493. doi: 10.1093/cvr/cvt107.
22. Nilsson J. Cytokines and smooth muscle cells in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 1993;27(7):1184-1190. doi: 10.1093/cvr/27.7.1184.
23. Romano M., Sironi M., Toniatti C., Polentarutti N., Fruscella P., Ghezzi P., Faggioni R., Luini W., van Hinsbergh V., Sozzani S., Bussolino F., Poli V., Ciliberto G., Mantovani A. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity.* 1997;6(3):315-325. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80334-9.
24. Apostolakis S., Vogiatzi K., Amanatidou V., Spandidos D.A. Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2009;84(3):353-360. doi: 10.1093/cvr/cvp241.

REFERENCES

1. Libby P., Ridker P.M., Hansson G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 2011;473(7347):317-325. doi: 10.1038/nature10146.
2. Bentzon J.F., Otsuka F., Virmani R., Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res.* 2014;114(12):1852-1866. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302721.
3. Pulliero A., Godschalk R., Andreassi M.G., Curfs D., Van Schooten F.J., Izzotti A. Environmental carcinogens and mutational pathways in atherosclerosis. *Int J Hyg Environ Health.* 2015;218(3):293-312. doi: 10.1016/j.ijheh.2015.01.007.
4. Kutikhin A.G., Sinitsky M.Y., Ponasenko A.V. Role of mutagenesis in atherosclerosis. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2017;(1):92-101 (in Russian). doi: 10.17802/2306-1278-2017-1-92-101.
5. Binková B., Smerhovský Z., Strejc P., Boubelík O., Stávková Z., Chvátalová I., Srám R.J. DNA-adducts and atherosclerosis: a study of accidental and sudden death males in the Czech Republic. *Mutat Res.* 2002;501(1-2):115-128. doi: 10.1016/s0027-5107(02)00019-2.
6. Nair J., De Flora S., Izzotti A., Bartsch H. Lipid peroxidation-derived etheno-DNA adducts in human atherosclerotic lesions. *Mutat Res.* 2007;621(1-2):95-105. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2007.02.013.
7. GBD 2017 Causes of Death Collaborators. 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.* 2018;392(10159):1736-1788. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32203-7.
8. Rosefort C., Fauth E., Zankl H. Micronuclei induced by aeneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis.* 2004;19(4):277-284. doi: 10.1093/mutage/geh028.
9. Lorge E., Thybaud V., Aardema M.J., Oliver J., Wakata A.,

Lorenzon G., Marzin D. SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutat Res.* 2006;607(1):13-36. doi: 10.1016/j.mrgentox.2006.04.006.

10. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611-622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.

11. Weakley S.M., Jiang J., Kougiou P., Lin P.H., Yao Q., Brunicardi F.C., Gibbs R.A., Chen C. Role of somatic mutations in vascular disease formation. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010;10(2):173-185. doi: 10.1586/erm.10.1.

12. Kirsch-Volders M., Bonassi S., Knasmueller S., Holland N., Bolognesi C., Fenech M.F. Commentary: critical questions, misconceptions and a road map for improving the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for in vivo biomonitoring of human exposure to genotoxic chemicals-a HUMN project perspective. *Mutat Res.* 2014;759:49-58. doi: 10.1016/j.mrrev.2013.12.001.

13. 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. Interstrand DNA cross-links induced by alpha, beta-unsaturated aldehydes derived from lipid peroxidation and environmental sources. *Acc Chem Res.* 2008;41(7):793-804. doi: 10.1021/ar700246x.

14. 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(3):446-53. doi: 10.1093/carcin/bgi254.

15. Sinitsky M.Y., Kutikhin A.G., Tsepokina A.V., Shishkova D.K., Asanov M.A., Yuzhalin A.E., Minina V.I., Ponosenko A.V. Mitomycin C induced genotoxic stress in endothelial cells is associated with differential expression of proinflammatory cytokines. *Mutat Res.* 2020;858-860:503252. doi: 10.1016/j.mrgentox.2020.503252.

16. Sinitsky M.Y., Tsepokina A.V., Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Ponosenko A.V. The gene expression signature

in endothelial cells exposed to mitomycin C. *Biomedical Chemistry.* 2021;67(2):130-136 (in Russian). doi: 0.18097/pbmc20216702130.

17. Cai Q., Lanting L., Natarajan R. Growth factors induce monocyte binding to vascular smooth muscle cells: implications for monocyte retention in atherosclerosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287:707-714. doi: 10.1152/ajpcell.00170.2004.

18. Lim S., Park S. Role of vascular smooth muscle cell in the inflammation of atherosclerosis. *BMB Rep.* 2014;47(1):1-7. doi: 10.5483/bmbrep.2014.47.1.285.

19. Lee G.L., Chang Y.W., Wu J.Y., Wu M.L., Wu K.K., Yet S.F., Kuo C.C. TLR 2 induces vascular smooth muscle cell migration through cAMP response element-binding protein-mediated interleukin-6 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:2751-2760. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300302.

20. Yang X., Coriolan D., Murthy V., Schultz K., Golenbock D.T., Beasley D. Proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells: role of efficient Toll-like receptor 4 signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:1069-1076. doi: 10.1152/ajpheart.00143.2005.

21. Lee J.H., Joo J.H., Kim J., Lim H.J., Kim S., Curtiss L., Seong J.K., Cui W., Yabe-Nishimura C., Bae Y.S. Interaction of NADPH oxidase 1 with Toll-like receptor 2 induces migration of smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2013;99:483-493. doi: 10.1093/cvr/cvt107.

22. Nilsson J. Cytokines and smooth muscle cells in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 1993;27(7):1184-1190. doi: 10.1093/cvr/27.7.1184.

23. Romano M., Sironi M., Toniatti C., Polentarutti N., Fruscella P., Ghezzi P., Faggioni R., Luini W., van Hinsbergh V., Sozzani S., Bussolino F., Poli V., Ciliberto G., Mantovani A. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity.* 1997;6(3):315-325. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80334-9.

24. Apostolakis S., Vogiatzi K., Amanatidou V., Spandidos D.A. Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2009;84(3):353-360. doi: 10.1093/cvr/cvp241.

Для цитирования: Синицкий М.Ю., Синицкая А.В., Шишкова Д.К., Хуторная М.В., Асанов М.А., Понасенко А.В. Оценка экспрессии провоспалительных цитокинов в гладкомышечных клетках коронарной артерии, экспонированных мутагеном алкилирующего механизма действия. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2022;11(4): 158-166. DOI: 10.17802/2306-1278-2022-11-4-158-166

To cite: Sinitsky M.Yu., Sinitskaya A.V., Shishkova D.K., Khutornaya M.V., Asanov M.A., Ponosenko A.V. Gene expression of proinflammatory cytokines in human coronary artery smooth muscle cells exposed to alkylating mutagen. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2022;11(4): 158-166. DOI: 10.17802/2306-1278-2022-11-4-158-166