

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

DOI: 10.15372/ATER20180401

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СКАВЕНДЖЕР-РЕЦЕПТОРОВ И МОЛЕКУЛ КЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ
В КУЛЬТУРАХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА,
ЭКСПОНИРУЕМЫХ МИНЕРАЛЬНО-ОРГАНИЧЕСКИМИ НАНОЧАСТИЦАМИМ.Ю. Синицкий^{1,2}, Е.А. Великанова¹, Д.К. Шишкова¹, А.В. Понасенко¹, А.Г. Кутихин¹¹ ФГБНУ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний
650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6² ФГБНУ Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН
650000, г. Кемерово, просп. Советский, 18

Цель исследования. Изучить особенности экспрессии генов, кодирующих белки, потенциально ответственные за эндотелиотоксичность минерально-органических наночастиц (бионов), а именно генов скавенджер-рецепторов *SCARF1*, *MSR1*, *CD36*, *LDLR*, *VLDLR* и генов клеточной адгезии *VCAM1*, *ICAM1*, *PECAM1*, *SELE*, *SELP* и *CDH5* в культурах эндотелиальных клеток, экспонируемых магний-фосфатными (МФБ) и кальций-фосфатными (КФБ) бионами. **Материал и методы.** Материалом исследования послужила культура иммортализованных венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926, а также коммерческие культуры первичных эндотелиальных клеток коронарной (НСАЕС) и внутренней грудной (НТАЕС) артерий. Клеточные культуры культивировали в присутствии искусственно синтезированных МФБ и КФБ и чистого фосфатно-солевого буфера (контроль). Непосредственно после окончания культивирования проведено выделение тотальной РНК из образцов изучаемых клеточных линий. На основе выделенной РНК с помощью реакции обратной транскрипции проведен синтез одноцепочечной кДНК. Оценка генной экспрессии в культурах венозных и первичных артериальных эндотелиальных клеток, культивируемых в присутствии МФБ и КФБ, проведена с помощью метода количественной ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени с флуоресцентным красителем SYBRGreen. Статистическая обработка результатов осуществлялась в программе GraphPadPrism 6 (GraphPadSoftware). **Результаты.** Экспозиция клеток культуры EA.hy 926 МФБ не вызвала значительных изменений экспрессии изученных генов, кроме *SELP* и *SELE*, по сравнению с контролем. Двукратные изменения экспрессии показаны для генов *SCARF1* и *CD36* в культуре, экспонированной сферическими КФБ (СКФБ), а также для гена *ICAM1* в культуре, экспонированной игольчатыми КФБ (ИКФБ). Воздействие на культуры НСАЕС и НТАЕС КФБ приводило к ярко выраженному снижению экспрессии генов *CD36* и *SELP* и увеличению экспрессии гена *ICAM1* как в НСАЕС, так и НТАЕС. Кроме этого в культуре НСАЕС отмечено увеличение экспрессии генов *VCAM1* и *SELE* в 2,5 раза в ответ на действие ИКФБ, а культура НТАЕС характеризовалась двукратно повышенной экспрессией гена *VLDLR* (при культивировании в присутствии обоих типов КФБ) и *PECAM1* (при культивировании в присутствии СКФБ). МФБ практически не влияли на экспрессию изученных генов в культурах EA.hy 926 и

Синицкий Максим Юрьевич – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии, НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний; инженер-технолог 1-й категории, Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН, e-mail: max-sinitsky@rambler.ru

Великанова Елена Анатольевна – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории клеточных технологий отдела экспериментальной и клинической кардиологии, e-mail: veliea@kemcardio.ru

Шишкова Дарья Кирилловна – младший научный сотрудник лаборатории фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии, e-mail: shidk@kemcardio.ru

Понасенко Анастасия Валериевна – канд. мед. наук, зав. лабораторией геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии, e-mail: ponaav@kemcardio.ru

Кутихин Антон Геннадьевич – канд. мед. наук, зав. лабораторией фундаментальных аспектов атеросклероза отдела экспериментальной и клинической кардиологии, e-mail: antonkutikhin@gmail.com

НСАЕС, но в то же время усиливали экспрессию гена *PECAM1* и снижали экспрессию генов *SELP* и *CDH5* в культуре НТАЕС. **Заключение.** Химический состав и морфология бионов, а также физиологические особенности сосудов влияют на профиль генной экспрессии в культурах эндотелиальных клеток.

Ключевые слова: бионы, наночастицы, эндотелиотоксичность, эндотелий, генная экспрессия, количественная ПЦР.

Минерально-органические наночастицы, образующиеся в организме человека, впервые описаны в 90-х годах XX века коллективом финских ученых [1], и на протяжении последующего десятилетия их природа и причина возникновения достаточно активно обсуждались в мировом научном сообществе [2]. На сегодняшний день известно, что минерально-органические наночастицы (также называемые бионами) могут быть искусственно синтезированы из солей различных катионов и фосфатов [3], а их образование является своеобразным физиологическим механизмом, регулирующим минеральный гомеостаз [4]. При этом накопление бионов в организме человека происходит при повышении концентрации ионов кальция и фосфора или при нарушении механизмов, препятствующих их выведению из биологических жидкостей [3, 4].

В экспериментах *in vivo* показано, что бионы образуются в результате химического взаимодействия ионов кальция, фосфатов и сывороточного белка фетуина-А, регулирующего фосфорно-кальциевый метаболизм и препятствующего пассивной эктопической кальцификации [2]. Помимо данного белка, в образовании бионов могут также участвовать и другие белки сыворотки крови, к примеру, альбумин и аполипопротеин-А1 [5]. В качестве неорганического компонента в состав бионов могут входить такие соединения, как магнийфосфатгидрат $Mg_2(P_2O_7)(H_2O)$ (магний-фосфатные бионы, МФБ), гидроксипатит $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ и карбонатгидроксипатит $Ca_{10}(PO_4)_3(CO_3)_3(OH)_2$ (кальций-фосфатные бионы, КФБ). Известно, что КФБ могут иметь различную морфологию – умеренное перенасыщение сывороточной среды ионами кальция и фосфора приводит к образованию сферических КФБ (СКФБ), а тяжелое перенасыщение – игольчатых КФБ (ИКФБ) [6].

В ряде эпидемиологических исследований показано, что бионы связаны с клиническими проявлениями атеросклероза, а факторы риска данного патологического процесса и кальцификации клапанов сердца сходны с факторами риска образования бионов [7]. Сферические структуры, по своей морфологии и составу сходные с КФБ, обнаружены в клапанах сердца, аорте и коронарных артериях вне зависимости от наличия атеросклероза или кальцификации [8], а так-

же в кальцифицированных биопротезах клапанов сердца, пораженной по типу «кораллового рифа» аорте и подвздошных артериях пациентов с уремией [9], что позволило предположить роль бионов в развитии сердечно-сосудистой патологии. Ранее нашей группой показано, что КФБ обладают специфичной токсичностью для эндотелия [10], однако молекулярные механизмы этого явления на настоящий момент остаются неизученными. Для улучшения понимания развития вызываемого КФБ повреждения эндотелия и специфичности цитотоксического действия различных типов бионов представляется целесообразным исследовать молекулярно-генетические механизмы, связанные с вызванным бионами повреждением эндотелиальных клеток, что особенно актуально в условиях высокой заболеваемости атеросклерозом, являющимся причиной абсолютного большинства (>70 %) смертей от сердечно-сосудистых заболеваний [11].

Таким образом, целью данной работы явилось изучение особенностей экспрессии генов, кодирующих белки, потенциально ответственные за эндотелиотоксичность бионов, а именно генов скавенджер-рецепторов *SCARF1*, *MSR1*, *CD36*, *LDLR*, *VLDLR* и генов клеточной адгезии *VCAM1*, *ICAM1*, *PECAM1*, *SELE*, *SELP* и *CDH5* в культурах эндотелиальных клеток, экспонируемых МФБ и КФБ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом исследования послужила культура иммортализованных венозных эндотелиальных клеток человека линии EA.hy 926, предоставленная доктором S. Cora-Jean Edgell (Университет Северной Каролины в Чейпел-Хилл, США) и представляющая собой гибридому эндотелиальных клеток пупочной вены человека и линии аденокарциномы легкого A549, сохраняющую все основные морфологические и функциональные свойства венозных эндотелиальных клеток человека; а также коммерческие культуры первичных эндотелиальных клеток коронарной (human coronary artery endothelial cells, НСАЕС; Cell Applications) и внутренней грудной (human internal thoracic artery endothelial cells, НТАЕС; Cell Applications) артерий доноров-мужчин 27 и 50 лет соответственно.

Для проведения эксперимента клетки линии EA.hy 926 культивировались в среде DMEM/F12 (Gibco), содержащей 10 % фетальной телячьей сыворотки, 2 % гипоксантина-аминоптерина-тимидина (Gibco), 1 % HEPES-буфера (Gibco), 1 % L-глутамина-пенициллина-стрептомицина (Gibco) и 0,4 % амфотерицина В (Gibco), до достижения конfluenceности около 50 % (разреженная модель) или около 90 % (конфлюэнтная модель). Затем к культуре добавляли искусственно синтезированные МФБ, СКФБ или ИКФБ [12] с мутностью суспензии 0,5 стандарта МакФарланда (оптическая плотность на длине волны 650 нм составляла 0,08–0,10) из расчета 100 мкл на лунку 6-луночного планшета (21 лунка на группу) и культивировали в течение 24 часов (разреженная модель) или четырех часов (конфлюэнтная модель). Культуры НСАЕС и НТАЕС в соответствии с рекомендациями производителя перед началом эксперимента размораживались в среде для роста клеток MesoEndoCell Growth Medium («Cell Applications»). После четырех – пяти пассажей культуры НСАЕС и НТАЕС рассеивали в лунки 6-луночного планшета и культивировали до 90 % конfluenceности, после чего добавляли МФБ, СКФБ и ИКФБ (аналогично эксперименту с линией EA.hy 926, 11 лунок на группу) и культивировали в течение 24 часов. В качестве контроля использованы клеточные культуры EA.hy 926, НСАЕС и НТАЕС, в которые был добавлен чистый фосфатно-солевой буфер в том же объеме (100 мкл) с последующим аналогичным временем культивирования. Все эксперименты с клетками проводились в стерильных условиях при 37 °C, 5 % CO₂ и высокой влажности.

Непосредственно после окончания культивирования проведено выделение тотальной РНК из образцов изученных клеточных линий. Перед началом эксперимента рабочая зона и все используемое оборудование обрабатывались 0,01 % раствором диэтилпирикарбоната (ингибитор рибонуклеаз). Выделение РНК из клеточных суспензий (три репликаты по шесть лунок одного планшета в случае с линией EA.hy 926 и по три или четыре лунки в случае с НСАЕС и НТАЕС) проводилось с помощью коммерческих наборов RNeasy®Plus Universal Mini Kit (Qiagen) для конфлюэнтной культуры EA.hy 926 и Arcturus®-PicoPure®RNAIsolationKit (Applied Biosystems) для культур НСАЕС и НТАЕС по стандартным протоколам, предложенным производителями наборов, а также с помощью тризола (TRIzol Reagent, Invitrogen) по стандартному протоколу с последующим осаждением РНК ацетатом натрия для разреженной культуры EA.hy 926. Концентрация и качество выделенной РНК оценивались с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Ther-

moScientific, США) путем измерения поглощения света при длинах волн 280, 260 и 230 нм и расчета соотношений $A_{260/280}$ и $A_{260/230}$. Целостность РНК проверялась электрофорезом образцов в 3 % агарозном геле с последующей визуализацией с помощью системы GelDoc™ XR ++ System (BioRad, США). Выделенная РНК хранилась до следующего этапа эксперимента при температуре –70 °C.

На основе выделенной РНК с помощью реакции обратной транскрипции проведен синтез одноцепочечной кДНК согласно протоколу коммерческого набора High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) на термоциклере Veriti™ (Applied Biosystems, США). Концентрация и качество синтезированной кДНК также оценивались с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). Синтезированная кДНК хранилась при температуре –20 °C.

Экспрессия генов *SCARF1*, *MSR1*, *CD36*, *LDLR*, *VLDLR*, *VCAM1*, *ICAM1*, *PECAM1*, *SELE*, *SELP* и *CDH5* оценивалась при помощи количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) с детекцией результата в режиме реального времени с флуоресцентным красителем SYBR Green на амплификаторе ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Праймеры разработаны с использованием баз данных для поиска праймеров PrimerBank и RTPPrimerDB и мануального скрининга в Google с последующей проверкой их качества в программах PRaTo и PCRPrimerStats. Праймеры были синтезированы ЗАО «Евроген» (Москва) (табл. 1). Готовили реакционную смесь общим объемом 10 мкл, содержащую 5 мкл мастер-микса PowerUp™SYBR®Green-MasterMix (Applied Biosystems), по 500 нМ прямого и обратного праймеров и 10 нг кДНК. ПЦР проводили в стандартной 96-луночной оптической плашке, содержащей, помимо 26 анализируемых образцов, пять стандартов с двукратным разведением и отрицательный контроль (реакционная смесь, не содержащая кДНК). На каждый тестируемый образец, стандарт и отрицательный контроль готовилось по три технические репликаты. Амплификацию осуществляли в течение 45 циклов по следующей схеме: денатурация – 15 с при 95 °C, отжиг – 15 с при 52–56 °C (в зависимости от температуры плавления соответствующих праймеров, см. таблицу), элонгация – 1 мин при 72 °C с последующей проверкой специфичности реакции посредством построения и анализа кривых плавления. Нормализация результатов ПЦР проводилась с помощью трех референсных генов (генов «домашнего хозяйства») *ACTB*, *GAPDH* и *B2M* в соответствии с общепринятыми на настоящий момент рекомендациями

Характеристика праймеров, использованных в эксперименте

Ген	Последовательность	Температура плавления, °С
<i>SCARF1</i>	Forward: 5'-CCGATCAGACCTCAAGGACAG-3' Reverse: 5'-CCCAGGGTAGCTTGTGGGA-3'	56
<i>MSR1</i>	Forward: 5'-TTCACCAGTATGCAGAGACAC-3' Reverse: 5'-TCCGAAGTGGGATAGAGGAACT-3'	55
<i>CD36</i>	Forward: 5'-GGCTGTGACCGGAACTGTG-3' Reverse: 5'-AGGTCTCCAAGTGGCATTAGAA-3'	55
<i>LDLR</i>	Forward: 5'-ACGGCGTCTCTTCCTATGACA-3' Reverse: 5'-CCCTTGGTATCCGCAACAGA-3'	55
<i>VLDLR</i>	Forward: 5'-AGAAAAGCCAAATGTGAACCCT-3' Reverse: 5'-CACTGCCGTCAACACAGTCT-3'	54
<i>VCAM1</i>	Forward: 5'-CGTCTTGGTCAGCCCTTCCT-3' Reverse: 5'-ACATTCATATACTCCCGCATCCTTC-3'	56
<i>ICAM1</i>	Forward: 5'-TTGGGCATAGAGACCCCGTT-3' Reverse: 5'-GCACATTGCTCAGTTCATACACC-3'	55
<i>PECAM1</i>	Forward: 5'-TGGCGCATGCCTGTAGTA-3' Reverse: 5'-TCCGTTTCCTGGGTCAA-3'	52
<i>SELE</i>	Forward: 5'-GCACAGCCTTGTCCAACC-3' Reverse: 5'-ACCTCACCAAACCTTCG-3'	55
<i>SELP</i>	Forward: 5'-ATGGGTGGGAACCAAAAAGG-3' Reverse: 5'-GGCTGACGGACTCTTGATGTAT-3'	55
<i>CDH5</i>	Forward: 5'-AAGCGTGAGTCGCAAGAATG-3' Reverse: 5'-TCTCCAGTTTTTCGCCAGTG-3'	55
<i>ACTB</i>	Forward: 5'-CATCGAGCACGGCATCGTCA-3' Reverse: 5'-TAGCACAGCCTGGACAGCAAC-3'	56
<i>GAPDH</i>	Forward: 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3' Reverse: 5'-GCCCAATACGACCAAAATCC-3'	53
<i>B2M</i>	Forward: 5'-TCCATCCGACATTTGAAGTTG-3' Reverse: 5'-CGGCAGGCATACTCATCTT-3'	53

[13]. Для оценки эффективности ПЦР анализировали графики амплификации и стандартные кривые в программе QuantStudio™ Real-Time PCR Software v.1.3 (Applied Biosystems). Экспрессию изучаемых генов рассчитывали по Pfaffl-методу [14] и выражали на логарифмической (\log_{10}) шкале в виде кратного изменения относительно контрольных образцов. Обработку результатов проводили в программе GraphPadPrism 6 (GraphPadSoftware).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В нашем эксперименте использованы два различных коммерческих набора для выделения тотальной РНК из образцов биологического материала, а также тризол (смесь фенола и гуанидинтиоцианата). Для выделения РНК из конфлюэнтной культуры EA.hy 926 нами применялся набор RNeasy® Plus Universal Mini Kit («Qiagen»), так как он позволяет получить РНК высокого качества практически из любых тканей и клеток, а сама процедура выделения РНК занимает менее двух часов, а для разреженной культуры — тризол, с последующей очисткой образцов РНК посредством их осаждения ацетатом натрия. Концентрация РНК, выделенной из данных клеток, ва-

рировала от 52,3 до 870,5 нг/мкл, образцы не содержали примесей белков (значения $A_{260/280}$ составляли от 2,01 до 2,11 при норме для «чистой» РНК не менее 2,00) и органических соединений (значения $A_{260/230}$ составляли от 1,81 до 2,26 при норме для «чистой» РНК не менее 1,80). В случае культур НСАЕС и НИТАЕС выделение РНК проводилось из меньшего количества клеток с помощью набора Arcturus® PicoPure® RNA Isolation Kit («Applied Biosystems»), специально разработанного для микрообъемов биологического материала. В результате было получено от 66,1 до 448,7 нг/мкл чистой тотальной РНК (значение $A_{260/280}$ варьировало от 2,06 до 2,18; $A_{260/230}$ — от 1,83 до 2,17). Все полученные образцы РНК не имели признаков дегградации и контаминации геномной ДНК.

После проведения реакции обратной транскрипции нами получены образцы кДНК с высокой степенью очистки ($A_{260/280}$ — 1,79–1,81 при норме для «чистой» ДНК около 1,80; $A_{260/230}$ — 2,12–2,34 при норме для «чистой» ДНК не менее 2,00) и концентрацией от 1466,9 до 2351,6 нг/мкл. На основе полученных образцов кДНК были приготовлены рабочие растворы с концентрацией 10 нг/мкл, которые и использовались в дальнейших экспериментах.

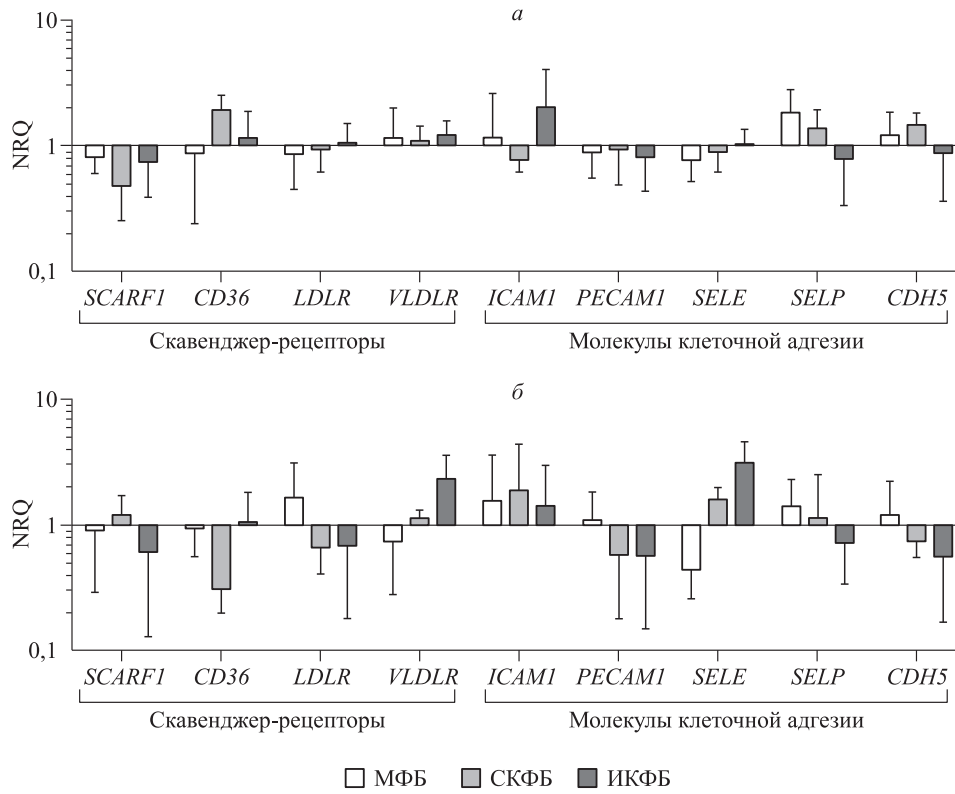


Рис. 1. Профиль генной экспрессии в иммортализованных венозных эндотелиальных клетках человека: *a* – конфлюэнтная культура, *б* – разреженная культура. NRQ – нормализованный уровень экспрессии

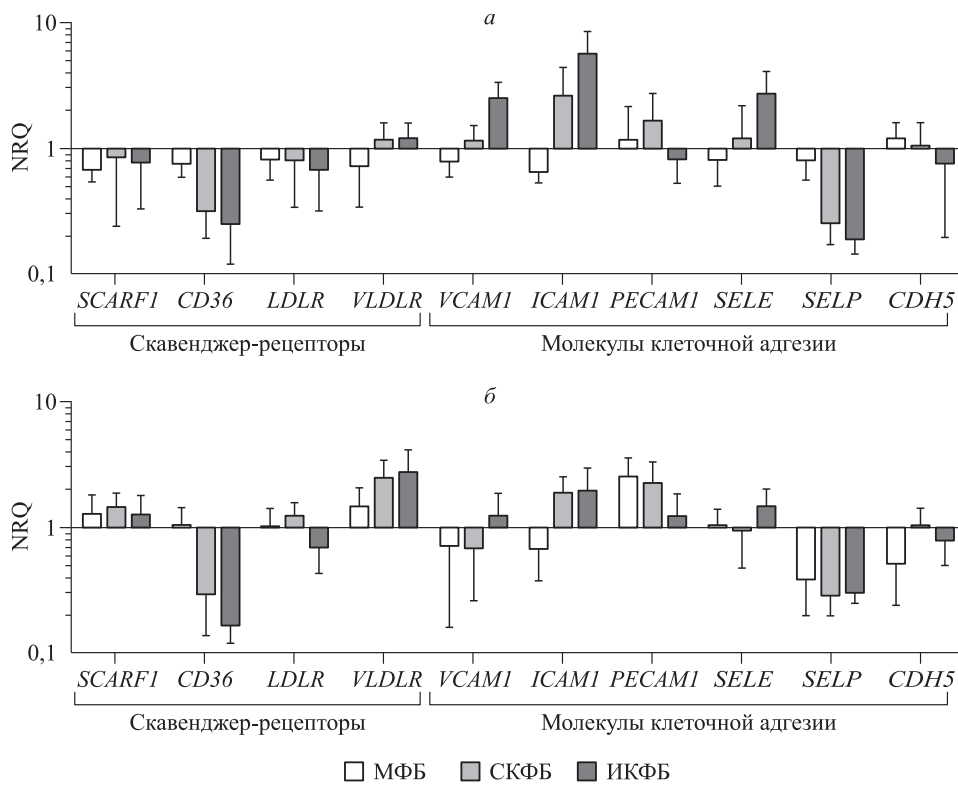


Рис. 2. Профиль генной экспрессии в эндотелиальных клетках коронарной (*a*) и внутренней грудной (*б*) артерий человека. NRQ – нормализованный уровень экспрессии

В результате нашего эксперимента обнаружено, что иммортализованные венозные эндотелиальные клетки человека линии EA.hy 926 не экспрессируют два из одиннадцати изученных генов — *MSR1* и *VCAM1*. Экспозиция клеток МФБ не вызвала значительных изменений экспрессии изученных генов, кроме *SELP* и *SELE*, по сравнению с контрольной культурой (рис. 1). КФБ, независимо от своей морфологии, практически не модифицировали экспрессию генов *LDLR*, *VLDLR*, *PECAM1* и *SELE* в конфлюэнтной культуре. Наиболее выраженные (двукратные) изменения экспрессии показаны для генов *SCARF1* и *CD36* в культуре, экспонированной СКФБ, а также для гена *ICAM1* в культуре, экспонированной ИКФБ (см. рис. 1, а). При этом в разреженной культуре профиль экспрессии изученных генов менялся по сравнению с конфлюэнтной культурой (см. рис. 1, б).

Культуры первичных эндотелиальных клеток НСАЕС и НПАЕС в целом характеризовались более выраженным ответом на экспозицию биомам по сравнению с линией EA.hy 926. Так, воздействие на культуры КФБ приводило к ярко выраженному снижению (от 3 до 6 раз) экспрессии генов *CD36* и *SELP* и увеличению (от 2 до 6 раз) экспрессии гена *ICAM1* как в НСАЕС, так и НПАЕС по сравнению с контролем (см. рис. 2). Кроме этого в культуре НСАЕС было отмечено увеличение экспрессии генов *VCAM1* и *SELE* в 2,5 раза в ответ на действие ИКФБ (см. рис. 2, а), а культура НПАЕС характеризовалась двукратно повышенной экспрессией гена *VLDLR* (при культивировании в присутствии обоих типов КФБ) и *PECAM1* (при культивировании в присутствии СКФБ) (см. рис. 2, б). МФБ практически не влияли на экспрессию изученных генов в культуре НСАЕС (см. рис. 2, а), но в то же время усиливали экспрессию гена *PECAM1* и снижали экспрессию генов *SELP* и *CDH5* в культуре НПАЕС (см. рис. 2, б). Ген *MSR1* в культурах первичных эндотелиальных клеток, как и в культуре EA.hy 926, не экспрессировался.

ОБСУЖДЕНИЕ

Из клинических исследований известно, что повышенный уровень ионов кальция и фосфора, а также сниженный уровень ингибиторов кальцификации фетуина-А и альбумина в крови ассоциированы с атеросклерозом и его клиническими проявлениями [15]. Ингибирование кальцификации данными белками происходит по различным механизмам, в частности, альбумин связывает ионы кальция посредством множественных отрицательно заряженных аминокислот на своей поверхности, а фетуин-А — фосфаты за

счет отрицательных зарядов β -слоя домена D1, которые занимают места фосфатных групп в кристаллах гидроксиапатита [6]. В свою очередь связывание фосфата кальция фетуином-А также осуществляется по двум различным механизмам. Первым из них является стабилизация мономерами фетуина-А субнаноразмерных кластеров фосфата кальция, а вторым — формирование КФБ, представляющих собой кристаллические частицы гидроксиапатита и карбонат-гидроксиапатита от 80 до 500 нм в диаметре, имеющих губчатую структуру и включающих в себя ряд белков сыворотки крови [6].

Так как повышенная концентрация ионов кальция и фосфора в организме является не только фактором риска развития атеросклероза, но и приводит к формированию биомам, нами выдвинута гипотеза о триггерной роли КФБ в развитии атеросклероза путем повреждения ими эндотелия, которая и была подтверждена в результате серий экспериментов. Интересно, что цитотоксические эффекты были характерны только для КФБ, так как МФБ, использованные в качестве контроля и отличающиеся от КФБ лишь входящим в их состав минеральным компонентом, не обладали токсичностью для эндотелиальных клеток. Кроме того, ИКФБ характеризовались большей эндотелиотоксичностью, чем СКФБ. Выявлено, что патогенное действие КФБ на сердечно-сосудистую систему обусловлено именно их токсичностью для эндотелия, а не прямой кальцификацией сосудов или влиянием на конформацию белков, участвующих в ингибировании кальцификации [10]. Все эти результаты обусловили необходимость изучения молекулярно-генетических механизмов наблюдаемого цитотоксического действия биомам на эндотелий.

К числу основных механизмов эндотелиотоксичности различных повреждающих агентов относится увеличение экспрессии молекул клеточной адгезии на плазматической мембране эндотелиальных клеток с соответствующим повышением адгезии клеток моноклеарной фракции крови к эндотелиальным клеткам [16], поэтому в данной работе мы оценили особенности экспрессии эндотелиальными клетками генов, кодирующих ключевые молекулы клеточной адгезии, играющие роль в патогенезе атеросклероза [17]. В результате проведенного эксперимента установлено, что КФБ вызывают однонаправленные эффекты, проявляющиеся в увеличении экспрессии генов *VCAM1*, *ICAM1*, *PECAM1*, *SELE* и снижении экспрессии гена *SELP* в культурах эндотелиальных клеток двух артерий — коронарной (наиболее часто поражаемой атеросклерозом) и внутренней грудной (наименее часто поражае-

мой атеросклерозом). Стоит также отметить, что в культуре НСАЕС экспозиция ИКФБ вызывала более выраженные изменения экспрессии изученных генов, чем в культуре НТАЕС. Можно предположить, что повышенная эндотелиотоксичность ИКФБ, которые в силу своей морфологии вызывают более выраженное повреждение клеток, нивелируется в культурах НТАЕС за счет более активной продукции клетками данной артерии оксида азота, обладающего атеропротективным действием. Интересным является тот факт, что один из изученных генов, кодирующих белок Р-селектин, характеризовался сниженной экспрессией в культурах артериальных эндотелиальных клеток, экспонированных бионами, несмотря на свидетельства о его роли как маркера атеросклероза [18].

Несмотря на то что органом-мишенью атеросклероза являются артерии, и любые эксперименты по изучению его патогенеза целесообразно проводить именно на культурах артериальных эндотелиальных клеток, более часто используются венозные эндотелиальные клетки, которые более доступны и просты в культивировании. В нашей работе мы оценили профиль генной экспрессии и в культурах венозных эндотелиальных клеток с целью его сравнения с данными, полученными в результате изучения культур первичных эндотелиоцитов. В результате проведенного эксперимента мы установили, что культуры венозных эндотелиальных клеток отличаются от первичных не только по уровню экспрессии одних и тех же генов, но и по самому профилю экспрессируемых генов – в культурах венозных эндотелиальных клеток не было обнаружено экспрессии гена *VCAM1* в отличие от культур НСАЕС и НТАЕС, что свидетельствует не только о разнице в физиологии эндотелия данных сосудов, но и о различии в молекулярно-генетических основах формирования ответа на повреждающее действие бионов.

Другим механизмом эндотелиотоксичности бионов может являться изменение функциональной активности скавенджер-рецепторов, которые локализуются на поверхности клетки и отвечают за распознавание и удаление не только модифицированных липопротеинов, но и целого ряда других агентов, обладающих повреждающим действием на эндотелий [19]. В нашем эксперименте только ген *CD36* экспрессировался значительно слабее в культурах первичных эндотелиальных клеток, экспонированных КФБ. Рецептор, кодируемый данным геном, отвечает за связывание липопротеинов низкой плотности, а его продукция прямо коррелирует с риском развития атеросклероза [20]. Полученные в нашем исследовании результаты, наоборот, свидетельствуют

о том, что КФБ ингибируют экспрессию данного гена, в отличие от гена *VLDLR*, экспрессия которого была повышена, но только в культуре НТАЕС. Профиль экспрессии генов скавенджер-рецепторов в венозных эндотелиальных клетках также отличался от профиля экспрессии в первичных культурах, что еще раз подтверждает различие в ответе различных типов сосудов на воздействие агентов, обладающих эндотелиотоксичностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненной работы мы впервые показали особенности изменения профиля генной экспрессии в культурах эндотелиальных клеток, полученных из различных типов сосудов и экспонированных минерально-органическими наночастицами, установили некоторые закономерности его изменения в зависимости от типа сосуда и бионов. Полученные данные приближают нас к пониманию молекулярно-генетических основ формирования эндотелиотоксичности минерально-органических наночастиц и их роли в патогенезе атеросклероза.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Кемеровской области в рамках научного проекта № 18-415-420005 «Клеточно-опосредованные механизмы проатеросклеротического действия кальций-фосфатных биомов».

ЛИТЕРАТУРА

1. **Kajander E.O., Ciftcioglu N.** Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998. Vol. 95, N 14. P. 8274–8279.
2. **Price P.A., Lim J.E.** The inhibition of calcium phosphate precipitation by fetuin is accompanied by the formation of a fetuin-mineral complex // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, N 24. P. 22144–22152.
3. **Wu C.Y., Young D., Martel J., Young J.D.** A story told by a single nanoparticle in the body fluid: demonstration of dissolution-reprecipitation of nanocrystals in a biological system // *Nanomedicine (Lond)*. 2015. Vol. 10, N 17. P. 2659–2576.
4. **Martel J., Peng H.H., Young D. et al.** Of nanobacteria, nanoparticles, biofilms and their role in health and disease: facts, fancy and future // *Nanomedicine (Lond)*. 2014. Vol. 9, N 4. P. 483–499.
5. **Кутихин А.Г., Великанова Е.А., Глушкова Т.В. и др.** Сходство минералоорганических наночастиц, выделенных из атеросклеротических бляшек и искусственно синтезированных минералоорганических наночастиц // *Медицина в Кузбассе*. 2015. Т. 14, № 4. С. 55–59.

6. **Wu C.Y., Young L., Young D. et al.** Bions: a family of biomimetic mineralo-organic complexes derived from biological fluids // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, N 9. P. e75501.
7. **Linefsky J.P., O'Brien K.D., Katz R. et al.** Association of serum phosphate levels with aortic valve sclerosis and annular calcification: the cardiovascular health study // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2011. Vol. 58, N 3. P. 291–297.
8. **Bertazzo S., Gentleman E., Cloyd K.L. et al.** Nano-analytical electron microscopy reveals fundamental insights into human cardiovascular tissue calcification // *Nat. Mater.* 2013. Vol. 12, N 6. P. 576–583.
9. **Schlieper G., Grottemeyer D., Aretz A. et al.** Analysis of calcifications in patients with coral reef aorta // *Ann. Vasc. Surg.* 2010. Vol. 24, N 3. P. 408–414.
10. **Kutikhin A.G., Velikanova E.A., Mukhamadiyarov R.A. et al.** Apoptosis-mediated endothelial toxicity but not direct calcification or functional changes in anti-calcification proteins defines pathogenic effects of calcium phosphate bions // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. P. 27255.
11. **Кутихин А.Г., Синицкий М.Ю., Понасенко А.В.** Роль мутагенеза в развитии атеросклероза // *Комплексные пробл. сердечно-сосудистых заболеваний*. 2017. Т. 6, № 1. С. 92–101.
12. **Кутихин А.Г., Великанова Е.А., Шишкова Д.К.** Форма кальций-фосфатных бионов определяет выраженность вызываемого ими проатеросклеротического сдвига профиля секретируемых эндотелиальными клетками цитокинов // *Евраз. кардиол. журн.* 2017. Т. 7, № 4. С. 4–15.
13. **Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F. et al.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes // *Genome Biol.* 2002. Vol. 3, N 7. P. research0034.1-0034.11.
14. **Pfaffl M.W.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic. Acids Res.* 2001. Vol. 29, N 9. P. e45.
15. **Sun Z.L., Xie Q.Y., Guo G.L. et al.** Serum fetuin-A levels in patients with cardiovascular disease: a meta-analysis // *Biomed. Res. Int.* 2014. Vol. 2014. P. 691540.
16. **Gimbrone M.A., García-Cardena G.** Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis // *Circ. Res.* 2016. Vol. 118, N 4. P. 620–636.
17. **Santos J.C.D., Cruz M.S., Bortolin R.H. et al.** Relationship between circulating VCAM-1, ICAM-1, E-selectin and MMP9 and the extent of coronary lesions // *Clinics (Sao Paulo)*. 2018. Vol. 73. P. e203.
18. **Bielinski S.J., Berardi C., Decker P.A. et al.** P-selectin and subclinical and clinical atherosclerosis: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) // *Atherosclerosis*. 2015. Vol. 240, N 1. P. 3–9.
19. **Canton J., Neculai D., Grinstein S.** Scavenger receptors in homeostasis and immunity // *Nat. Rev. Immunol.* 2013. Vol. 13, N 9. P. 621–634.
20. **Park Y.M.** CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis // *Exp. Mol. Med.* 2014. Vol. 46. P. e99.

**EXPRESSION OF SCAVENGER RECEPTOR AND CELL ADHESION MOLECULE GENES
IN HUMAN ENDOTHELIAL CELLS EXPOSED TO MINERAL-ORGANIC NANOPARTICLES**

M.Yu. Sinitsky^{1,2}, E.A. Velikanova¹, D.K. Shishkova¹, A.V. Ponasenko¹, A.G. Kutikhin¹

¹ *Scientific Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases
650002, Kemerovo, Sosnovy boul., 6*

² *Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry of SB RAS
650000, Kemerovo, Sovetskiy av., 8*

Aim. To study the expression of scavenger-receptor genes *SCARF1*, *MSR1*, *CD36*, *LDLR*, *VLDLR* and cell adhesion genes *VCAM1*, *ICAM1*, *PECAM1*, *SELE*, *SELP*, *CDH5* potentially responsible for endothelial toxicity of mineral-organic nanoparticles (bions) in cultures of endothelial cells exposed to magnesium phosphate (MPB) and calcium phosphate bions (CPB). **Materials and methods.** In this study we used the culture of human immortalized venous endothelial cells (EA.hy 926 line), as well as commercial cultures of primary human coronary (HCAEC) and internal thoracic artery endothelial cells (HITAEC). Cells were cultured in the presence of synthesized MPB and CPB and pure phosphate-saline buffer (control). Immediately after cultivation, total RNA was isolated from samples of the cell lines. Based on the isolated RNA, a single-stranded cDNA was synthesized using a reverse transcription reaction. Evaluation of gene expression in cell cultures was carried out using Real-Time quantitative PCR with a SYBR Green fluorescent dye. Statistical analysis of the results was performed in GraphPad Prism 6 software. **Results.** Exposure of EA.hy 926 cells by MPB did not lead to significant changes in the expression of the studied genes except *SELP* and *SELE* compared with non-exposed control. Two-fold change in gene expression was shown for the *SCARF1* and *CD36* genes in culture exposed to spherical CPB (SCPB), as well as for the *ICAM1* gene in culture exposed to needle-like CPB (NCPB). CPB exposure to HCAEC and HITAEC cultures resulted in a pronounced decrease of expression of the *CD36* and *SELP* genes and an increase of expression of the *ICAM1* gene both in HCAEC and HITAEC. Expression of the *VCAM1* and *SELE* genes was 2.5-fold higher in HCAEC exposed to NCPB and 2-fold increase of expression of the *VLDLR* gene HITAEC exposed to both types of CPB and the *PECAM1* exposed to SCPB. MPB had practically no effect on the expression of the studied genes in the EA.hy 926 and HCAEC cultures, but at the same time they increased the expression of the *PECAM1* gene and reduced the expression of the *SELP* and *CDH5* genes in HITAEC. **Conclusion.** The chemical composition and morphology of bions, as well as the physiological characteristics of vessels can affect to gene expression signature in cultures of endothelial cells.

Keywords: bions, nanoparticles, endothelial toxicity, endothelium, gene expression, quantitative PCR.

*Статья поступила 15 октября 2018 г.,
принята в печать 28 октября 2018 г.*