

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ СТРЕСС КАК ТРИГГЕР ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ  
ДИСФУНКЦИИ У КРЫС ЛИНИИ WISTAR: РЕЗУЛЬТАТЫ МОЛЕКУЛЯРНО-  
ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

© 2024 г. М. Ю. Синицкий<sup>1</sup>\*, А. В. Синицкая<sup>1</sup>, М. В. Хуторная<sup>1</sup>, М. А. Асанов<sup>1</sup>,  
Д. К. Шишкова<sup>1</sup>, А. О. Поддубняк<sup>1</sup>, А. В. Понасенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых  
заболеваний, Кемерово, Россия

\*E-mail: max-sinitsky@rambler.ru

Поступила в редакцию 28.12.2023 г.

После доработки 30.01.2024 г.

Принята к публикации 05.02.2024 г.

Атеросклероз и ишемическая болезнь сердца являются одними из ведущих причин инвалидизации и смертности среди населения. Показано, что генотоксический стресс потенциально может рассматриваться как новый триггер эндотелиальной дисфункции, лежащей в основе патогенеза данных заболеваний. Цель исследования – оценка молекулярно-генетических маркеров эндотелиальной дисфункции, ассоциированной с генотоксическим стрессом, у нормолипидемических крыс линии Wistar. В исследование были включены самцы крыс линии Wistar, получавшие инъекции алкилирующего мутагена митомицина С (ММС) в дозировке 0.5 мг/кг массы тела (экспериментальная группа) или 0.9%-ного раствора NaCl (контрольная группа) в хвостовую вену три раза в неделю на протяжении месяца. Уровень генотоксического стресса у животных оценивали с помощью микроядерного теста в полихроматофильных эритроцитах (ПХЭ); эндотелиальную дисфункцию идентифицировали путем оценки экспрессии генов *Vcam1*, *Icam1*, *Sele*, *Selp*, *Il6*, *Ccl2*, *Cxcl1*, *Mif*, *Vwf*, *Serpine1*, *Plau*, *Plat*, *Klf2*, *Klf4*, *Nfe2l2*, *Nos3*, *Snai1*, *Snai2*, *Twist1*, *Zeb1*, *Cdh5* и *Cdh2* в смывах эндотелиального монослоя нисходящей аорты. Установлено, что у крыс из экспериментальной группы развивается выраженный генотоксический стресс, о чем свидетельствует более чем трехкратное повышение частоты ПХЭ с микроядрами и снижение доли ПХЭ в общем пуле проанализированных эритроцитов. Анализ профиля генной экспрессии показал, что у крыс, включенных в экспериментальную группу, наблюдается провоспалительная активация эндотелия, сопровождающаяся повышенной экспрессией генов *Vcam1*, *Icam1*, *Selp*, *Il6*, *Ccl2* и *Cxcl1*, а также нарушение эндотелиальной механотрансдукции, характеризуемое снижением экспрессии генов *Klf2* и *Klf4*. Таким образом, ММС-индуцированный генотоксический стресс у нормолипидемических крыс линии Wistar ассоциирован с нарушением двух ключевых звеньев патогенеза эндотелиальной дисфункции и может рассматриваться в качестве одного из ее триггеров.

*Ключевые слова:* повреждение ДНК, мутагенез, атерогенез, эндотелий, микроядерный тест, экспрессия генов, мРНК

DOI: 10.31857/S0869813924040097, EDN: CNENSH

## ВВЕДЕНИЕ

Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения, атеросклероз и ишемическая болезнь сердца занимают одни из лидирующих позиций в структуре заболеваемости и смертности среди всех патологий сердечно-сосудистой системы [1] с тенденцией к росту до 2030 г. [2]. Доказано, что эндотелиальная дисфункция, определяемая как потеря эндотелием своей противовоспалительной, антитромботической и вазодилатирующей способности, является обязательным инициирующим фактором развития атеросклероза [3]. К числу общепризнанных триггеров дисфункции эндотелия относят турбулентный тип локального кровотока, низкое эндотелиальное напряжение сдвига, метаболический и химический стресс (сахарный диабет, высокий уровень холестерина в крови, курение) [4, 5]. Кроме того, к потенциальным факторам риска развития эндотелиальной дисфункции также можно отнести соматические мутации и повреждение ДНК [6]. Доказано, что генотоксический стресс в культурах первичных эндотелиальных клеток человека сопровождается провоспалительной активацией эндотелия и признаками эндотелиально-мезенхимального перехода, что, в свою очередь, является критериями эндотелиальной дисфункции [7–9]. Несмотря на имеющиеся данные, генотоксический стресс на настоящий момент не рассматривается в качестве подтвержденного патогенетически значимого фактора риска эндотелиальной дисфункции и не учитывается в актуальных клинических рекомендациях по терапии атеросклероза. Для научного обоснования генотоксического стресса как фактора риска дисфункции эндотелия и атеросклероза необходима, в частности, верификация результатов, полученных в экспериментах *in vitro* на моделях лабораторных животных.

Для моделирования генотоксического стресса в экспериментах *in vitro* и *in vivo* широко используется противоопухолевый антибиотик митоминин С (ММС) [10], являющийся алкилирующим агентом и проявляющий кластогенную активность [11]. В клетках млекопитающих ММС подвергается восстановительной активации до митозена, который, в свою очередь, в ходе реакции *N*-алкилирования взаимодействует с 7-*N*-гуаниновыми нуклеотидными остатками малой бороздки ДНК в месте расположения димеров CG, что приводит к образованию ковалентных сшивок между основаниями цепей ДНК, препятствующих процессам репликации и транскрипции [12]. Сходным механизмом действия на ДНК млекопитающих обладает также целый ряд эндогенных (побочные продукты метаболизма – бифункциональные альдегиды и азотистая кислота; свободные радикалы) и экзогенных (альдегиды и акролеин, присутствующие в пищевых добавках, пестицидах, табачном дыме и выхлопных газах; компоненты промышленных отходов – алкилгалогениды, алкены, спирты, кетоны, эфиры и сульфиды; ионизирующая радиация) генотоксических агентов [13–16], что позволяет использовать ММС в качестве модельного мутагена в генотоксикологических исследованиях.

Целью данного исследования явилась оценка молекулярно-генетических маркеров эндотелиальной дисфункции, ассоциированной с генотоксическим стрессом, у нормолипидемических крыс линии Wistar.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Моделирование генотоксического стресса*

В исследование были включены самцы нормолипидемических крыс линии Wistar (масса тела 150–200 г, возраст 10 недель), полученные из вивария отдела экспериментальной медицины Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (Кемерово, Россия). Животных распределяли по полипропиленовым клеткам, выстланным деревянной щепой, и обеспечивали

неограниченный доступ к пище и воде. На протяжении всего эксперимента животных содержали при стандартных температурных условиях ( $24 \pm 1$  °C), относительной влажности  $55 \pm 10\%$  и 12-часовых циклах смены света и темноты. Мониторинг состояния здоровья животных проводили ежедневно. Крыс по группам и клеткам распределяли без рандомизации и применения каких-либо критериев включения и исключения.

Для моделирования генотоксического стресса выполняли инъекции алкилирующего мутагена ММС (Santa Cruz Biotechnology, Inc., США) в дозировке 0.5 мг/кг массы тела (экспериментальная группа, 10 крыс) или 0.9%-ного раствора NaCl (контрольная группа, 10 крыс) в хвостовую вену три раза в неделю на протяжении одного месяца, без какого-либо хирургического вмешательства. Через сутки после последней инъекции животных выводили из эксперимента путем внутрибрюшинной инъекции пенто-барбитала натрия (100 мг/кг массы тела).

Дозировка ММС была выбрана на основе литературных данных [17, 18] и результатов собственных экспериментов [19]. Контроль массы тела животных и корректировку дозы ММС проводили еженедельно.

#### *Оценка уровня генотоксического стресса*

Уровень генотоксического стресса у животных, включенных в эксперимент, оценивали с помощью микроядерного теста в полихроматофильных эритроцитах (ПХЭ) [20, 21]. Эксплантированную бедренную кость очищали от остатков мышечной ткани и удаляли эпифизы, после чего вымывали костный мозг 1 мл эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США) в пробирки типа Эппендорф объемом 1.5 мл. Полученную клеточную суспензию центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин, удаляли надосадочную жидкость, приливали в каждую пробирку 500 мкл свежей эмбриональной телячьей сыворотки и ресуспендировали клетки. Далее пробирки снова центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин и частично удаляли надосадочную жидкость до ее финального объема 50–100 мкл. Клетки ресуспендировали и раскапывали на край сухих обезжиренных предметных стекол, после чего распределяли клеточную суспензию по всей площади предметного стекла и высушивали получившиеся препараты на воздухе. Далее препараты фиксировали в метаноле в течение 5 мин и окрашивали 2%-ным раствором красителя Гимза (ПанЭко, Россия) в течение 10 мин при комнатной температуре.

Полученные цитогенетические препараты кодировали и анализировали под световым микроскопом Zeiss Axiostar Plus (Carl Zeiss MicroImaging GmbH., Германия) при увеличении  $\times 1000$ . На каждом препарате анализировали 200 эритроцитов, определяя количество нормохроматофильных эритроцитов (НХЭ) и ПХЭ. Далее анализировали еще 1000 ПХЭ и отмечали клетки с микроядрами (МЯ). НХЭ, ПХЭ и МЯ идентифицировали согласно общепринятым критериям [21].

#### *Оценка маркеров эндотелиальной дисфункции*

Оценку маркеров эндотелиальной дисфункции проводили путем измерения экспрессии генов, участвующих в провоспалительной (*Vcam1*, *Icam1*, *Sele*, *Selp*, *Il6*, *Ccl2*, *Cxcl1*, *Mif*) и протромботической активации эндотелия (*Vwf*, *Serpine1*, *Plau*, *Plat*), нарушении эндотелиальной механотрансдукции (*Klf2*, *Klf4*, *Nfe2l2*) и синтеза оксида азота (*Nos3*), эндотелиально-мезенхимальном переходе (*Snai1*, *Snai2*, *Twist1*, *Zeb1*, *Cdh5*, *Cdh2*) [22] в эндотелиальном монослое аорт лабораторных животных. Эксплантированную нисходящую аорту промывали от остатков крови 0.9%-ным раствором NaCl, а затем смывали эндотелиальный монослой 1 мл лизирующего реагента QIAzol® Lysis Reagent (Qiagen, США) в 1.5-миллилитровую пробирку типа Эппен-

дорф [23]. Выделение РНК и ее очистку от геномной ДНК проводили с помощью коммерческого набора RNeasy® Plus Universal Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя набора. Концентрацию и качество выделенной РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop™ 2000 (ThermoScientific, США), а ее целостность – на флуориметре Qubit 4 (Invitrogen, США) с использованием набора реагентов Qubit™ RNA IQ Assay Kit (Invitrogen, США). Выделенную РНК хранили при температуре –80 °С.

На основе выделенной РНК с помощью коммерческого набора High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США) синтезировали комплементарную ДНК (кДНК), определяли ее концентрацию и качество на спектрофотометре NanoDrop™ 2000 (ThermoScientific, США). Синтезированную кДНК хранили при –20 °С.

Экспрессию генов интереса, а также референсных генов (*Actb*, *B2m*, *Tbp*) оценивали с помощью количественной ПЦР с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени (реал-тайм ПЦР) на амплификаторе ViiA 7 (Applied Biosystems, США) в строгом соответствии с общепринятыми на настоящий момент стандартами [24, 25]. ПЦР проводили в 96-луночной планшете (BIOFIL, Китай), содержащем, помимо анализируемых образцов, пять стандартов с двукратным разведением и отрицательный контроль (реакционная смесь без кДНК). На каждый анализируемый образец готовили 10 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл мастер-микса PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, США), по 500 нМ прямого и обратного SYBR Green праймеров (Евроген, Россия) (табл. 1) и 5 мкл кДНК с финальной концентрацией 10 нг/мкл. Каждый образец, стандарт и отрицательный контроль анализировали в трех технических повторах. Программа амплификации включала в себя три этапа: 2 мин при 50 °С, 2 мин при 95 °С, 15 с при 95 °С и 60 с при 60 °С (40 циклов). Экспрессию генов интереса рассчитывали по методу  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  и выражали в виде кратности ее изменения в экспериментальной группе относительно контроля.

#### Статистический анализ

**Таблица 1.** Характеристика праймеров, использованных в эксперименте

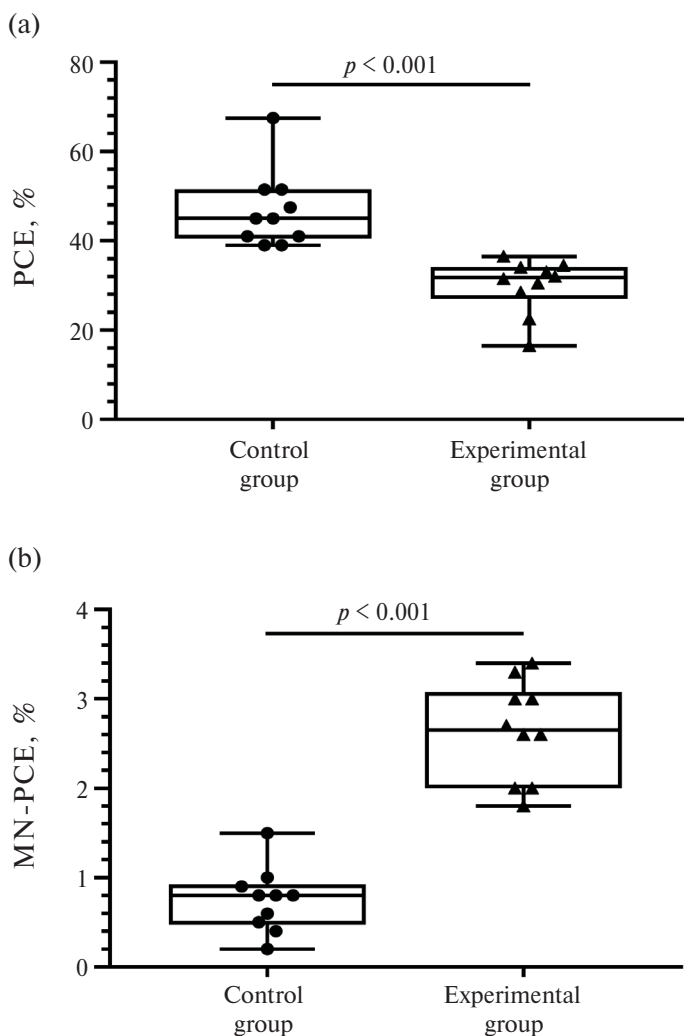
| Ген          | Последовательность   |
|--------------|--|
| <i>Vcam1</i> | Прямой: 5'-GGAAATGCCACCCTCACCTTA-3'<br>Обратный: 5'-TCCAGGGGAGATGTCAACACAGT-3' |
| <i>Icam1</i> | Прямой: 5'-CGACATTGGGGAAGACAGCAG-3'<br>Обратный: 5'-TCCACTCGCTCTGGGAACG-3'     |
| <i>Sele</i>  | Прямой: 5'-TGTGGTCCAAGAGGGGAGTG-3'<br>Обратный: 5'-GCCCACTGCAACTCATGTTCA-3'    |
| <i>Selp</i>  | Прямой: 5'-GCCCTCCAATGTGTGAAGCC-3'<br>Обратный: 5'-CAGGTGGAGCCGACACTGAA-3'     |
| <i>Il6</i>   | Прямой: 5'-AGCCACCAGGAACGAAAGTC-3'<br>Обратный: 5'-AGGGAAGGCAGTGGCTGTCA-3'     |
| <i>Ccl2</i>  | Прямой: 5'-ACGCTTCTGGGCTGTTGTT-3'<br>Обратный: 5'-TCCAGCCGACTCATTTGGGAT-3'     |
| <i>Cxcl1</i> | Прямой: 5'-CACTGCACCCAAACCGAAGT-3'<br>Обратный: 5'-TGGGGACACCCTTTAGCATCT-3'    |

| Ген             | Последовательность <span style="float: right;">Окончание табл. 1</span>        |
|-----------------|--|
| <i>Mif</i>      | Прямой: 5'-GTCACGTAGCTCAGGTCCCA-3'<br>Обратный: 5'-CTCGGAGAGAAACCCCTCTG-3'     |
| <i>Vwf</i>      | Прямой: 5'-AACCCACGCTTGACCAGTT-3'<br>Обратный: 5'-CTGTCAGCGCAGGAGCAAAC-3'      |
| <i>Serpine1</i> | Прямой: 5'-CTCAACCCAGGCCGACTTCA-3'<br>Обратный: 5'-CACTGTGCCGCTCTCGTTCA-3'     |
| <i>Plau</i>     | Прямой: 5'-GTGGTGGGAGCCTCATCAGT-3'<br>Обратный: 5'-CGCTTCGACTGACCCAGGTA-3'     |
| <i>Plat</i>     | Прямой: 5'-GGGACCAACTGAGGACTGCT-3'<br>Обратный: 5'-GCCCTCCACGCTGTGTAAGT-3'     |
| <i>Klf2</i>     | Прямой: 5'-CACCAACTGCGGCAAGACCT-3'<br>Обратный: 5'-GTAGTGGCGGGTAAGCTCGTCA-3'   |
| <i>Klf4</i>     | Прямой: 5'-GACTATGCAGGCTGTGGCAAA-3'<br>Обратный: 5'-CGGTAGTGCCTGGTCAAGTTCA-3'  |
| <i>Nfe2l2</i>   | Прямой: 5'-CAGTGGATCTGTCACTACTCC-3'<br>Обратный: 5'-CTCTCAACGTGGCTGGGAAT-3'    |
| <i>Nos3</i>     | Прямой: 5'-GGTGACCAGCACATTTGGCA-3'<br>Обратный: 5'-GCCGCCAAGAGGATAACAGT-3'     |
| <i>Snai1</i>    | Прямой: 5'-TGGGCCAACTTCCCAAGCA-3'<br>Обратный: 5'-GTGGGAGCAGGAGAAAGGCT-3'      |
| <i>Snai2</i>    | Прямой: 5'-GCCCAACTACAGCGAACTGGA-3'<br>Обратный: 5'-TGGAATGGAAGTCTGATGTCC-3'   |
| <i>Twist1</i>   | Прямой: 5'-ATGTCCGCGTCCCCTAGCA-3'<br>Обратный: 5'-CCCCACGCCCTGATTCTTGT-3'      |
| <i>Zeb1</i>     | Прямой: 5'-CCAGTGAAGGTGATCCAGCCA-3'<br>Обратный: 5'-CTTTTGGGTGGCGTGCAGT-3'     |
| <i>Cdh5</i>     | Прямой: 5'-ACAAGGACGTGGTGCCAGTA-3'<br>Обратный: 5'-GGGCATCCCATGTGCGAGA-3'      |
| <i>Cdh2</i>     | Прямой: 5'-ACCCAGGAAAAGTGGCAGGT-3'<br>Обратный: 5'-GCTGTGCTTGGCGAGTTGTC-3'     |
| <i>Actb</i>     | Прямой: 5'-ACAACSTTCTTGCAGTCTCTC-3'<br>Обратный: 5'-CCATACCCACCATCACACCT-3'    |
| <i>B2m</i>      | Прямой: 5'-GGTGACCGTGATCTTTCTGGTG-3'<br>Обратный: 5'-TGAGGAAGTTGGGCTTCCCATT-3' |
| <i>Tbp</i>      | Прямой: 5'-TGCCAAGTGTGAGCCTCTCC-3'<br>Обратный: 5'-TGGGTATCGCACGCACCAT-3'      |

Статистический анализ проводили с использованием программного пакета GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Для количественных показателей рассчитывали медиану (Me) и межквартильный размах (IQR). Различия между группами оценивали с помощью рангового *U*-критерия Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ уровня маркеров генотоксического стресса показал, что у животных из экспериментальной группы по сравнению с контролем отмечается полуторакратное снижение доли ПХЭ в общем пуле проанализированных эритроцитов ( $31.8 \pm 5.5\%$  против  $45.0 \pm 10.5\%$ ,  $p < 0.001$ ) и более чем трехкратное повышение частоты ПХЭ с МЯ ( $2.7 \pm 1.0\%$  против  $0.8 \pm 0.4\%$ ,  $p < 0.001$ ) (рис. 1), что свидетельствует о развитии выраженного генотоксического стресса в ответ на экспозицию ММС.

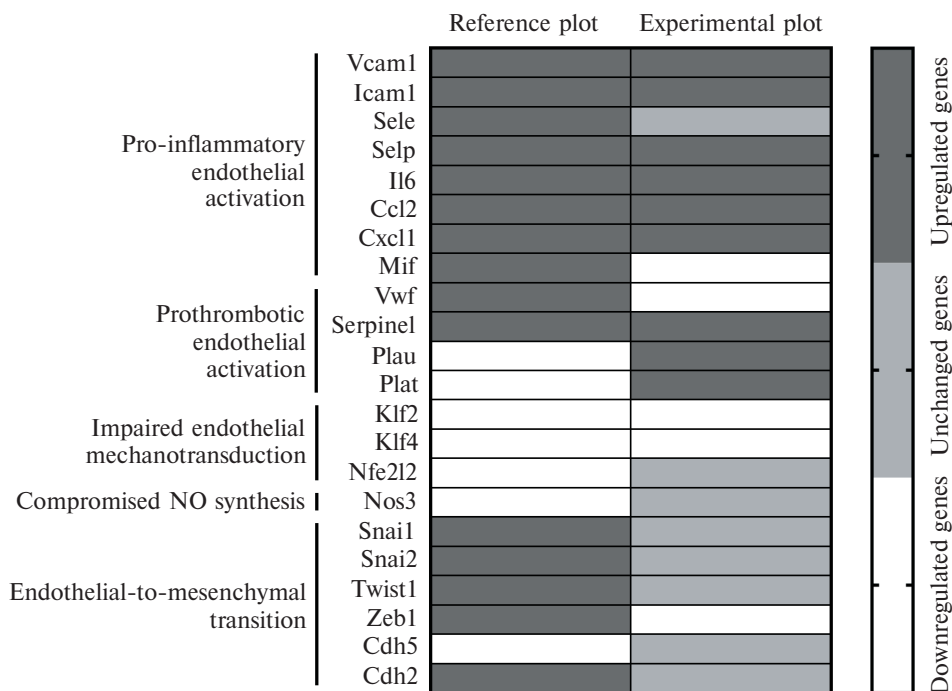


**Рис. 1.** Уровень маркеров генотоксического стресса у крыс линии Wistar. (a) – Доля ПХЭ. (b) – Частота ПХЭ с МЯ. Control group – контрольная группа, Experimental group – экспериментальная группа, PCE – ПХЭ, MN-PCE – ПХЭ с МЯ.

В результате проведенного молекулярно-генетического анализа все изученные гены были разделены на три группы в зависимости от характера изменения их экспрессии в экспериментальной группе относительно контроля: гены с повышенной экспрессией (кратность изменения экспрессии  $\geq 1.50$ ), гены с пониженной экспрессией ( $\leq 0.75$ ), гены, экспрессия которых не изменялась (0.76–1.49) (табл. 2).

**Таблица 2.** Изменение экспрессии генов-маркеров эндотелиальной дисфункции в эндотелии аорты крыс линии Wistar, включенных в экспериментальную группу, относительно контроля

| Ген  | Кратность изменения экспрессии | Характер изменения экспрессии |
|--|--------------------------------|-------------------------------|
| Провоспалительная активация эндотелия      |                                |                               |
| <i>Vcam1</i>                               | 2.17                           | Повышена                      |
| <i>Icam1</i>                               | 3.51                           | Повышена                      |
| <i>Sele</i>                                | 0.76                           | Без изменений                 |
| <i>Selp</i>                                | 2.59                           | Повышена                      |
| <i>Il6</i>                                 | 1.78                           | Повышена                      |
| <i>Ccl2</i>                                | 1.91                           | Повышена                      |
| <i>Cxcl1</i>                               | 2.06                           | Повышена                      |
| <i>Mif</i>                                 | 0.42                           | Понижена                      |
| Протромбическая активация эндотелия        |                                |                               |
| <i>Vwf</i>                                 | 0.58                           | Понижена                      |
| <i>Serpine1</i>                            | 2.26                           | Повышена                      |
| <i>Plau</i>                                | 1.95                           | Повышена                      |
| <i>Plat</i>                                | 1.76                           | Повышена                      |
| Нарушение эндотелиальной механотрансдукции |                                |                               |
| <i>Klf2</i>                                | 0.55                           | Понижена                      |
| <i>Klf4</i>                                | 0.60                           | Понижена                      |
| <i>Nfe2l2</i>                              | 0.87                           | Без изменений                 |
| Нарушение синтеза оксида азота             |                                |                               |
| <i>Nos3</i>                                | 1.12                           | Без изменений                 |
| Эндотелиально-мезенхимальный переход       |                                |                               |
| <i>Snai1</i>                               | 0.98                           | Без изменений                 |
| <i>Snai2</i>                               | 0.82                           | Без изменений                 |
| <i>Twist1</i>                              | 0.87                           | Без изменений                 |
| <i>Zeb1</i>                                | 0.65                           | Понижена                      |
| <i>Cdh5</i>                                | 1.10                           | Без изменений                 |
| <i>Cdh2</i>                                | 1.11                           | Без изменений                 |



**Рис. 2.** Сравнение полученного профиля генной экспрессии в эндотелии нисходящей аорты нормолипидемических крыс линии Wistar с референсной панелью для скрининга дисфункции эндотелия. Reference plot – референсная панель по данным Kutikhin и соавт. [22]; Experimental plot – экспериментальная панель, полученная в ходе проведения представленного исследования; Pro-inflammatory endothelial activation – провоспалительная активация эндотелия; Prothrombotic endothelial activation – протромботическая активация эндотелия; Impaired endothelial mechanotransduction – нарушение эндотелиальной механотрансдукции; Compromised NO synthesis – нарушение синтеза оксида азота; Endothelial-to-mesenchymal transition – эндотелиально-мезенхимальный переход. Upregulated genes – гены с повышенной экспрессией, Unchanged genes – гены, экспрессия которых не изменялась, Downregulated genes – гены со сниженной экспрессией.

В результате проведенного сравнения полученных результатов изучения профиля генной экспрессии в эндотелии нисходящей аорты нормолипидемических крыс линии Wistar с референсной панелью для скрининга дисфункции эндотелия [22] были выявлены совпадения в характере изменения экспрессии следующих генов-маркеров эндотелиальной дисфункции: *Vcam1*, *Icam1*, *Selp*, *Il6*, *Ccl2*, *Cxcl1*, *Serpine1*, *Klf2* и *Klf4* (рис. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ данных мировой литературы последних лет показывает рост интереса к изучению различных аспектов нормальной и патологической физиологии эндотелия, в том числе и к проблемам патофизиологических механизмов развития эндотелиальной дисфункции [22]. К настоящему моменту выделены ключевые признаки данного процесса, а именно: повышенная адгезия лейкоцитов к эндотелиальному монослою (провоспалительная активация эндотелия); нарушение синтеза биодоступного оксида азота; нарушение эндотелиальной механотрансдукции; эндотелиально-мезенхимальный переход, заключающийся в приобретении эндотелиальными клетками синтети-



ческого фенотипа; а также протромбическая активация эндотелия [26–30]. Наиболее удобным методом скрининга эндотелиальной дисфункции в эксперименте является оценка экспрессии маркерных генов, вовлеченных в вышеуказанные процессы, с помощью количественной ПЦР в силу относительно невысокой стоимости и низкой технической сложности данного метода. Анализ научной литературы, посвященной изучению патофизиологии эндотелиальной дисфункции, а также собственный многолетний опыт экспериментов по ее моделированию позволил разработать референсную панель для скрининга данного патологического состояния, включающую 23 маркерных гена, показавших наибольшую эффективность при диагностике эндотелиальной дисфункции в экспериментах *in vitro* и *in vivo* и обладающих высокой доказательной мощностью [22].

Одним из основных признаков эндотелиальной дисфункции является провоспалительная активация эндотелия, одним из результатов которой является миграция в интиму сосудов моноцитов. Мигрировавшие моноциты трансформируются в макрофаги, которые начинают поглощать свободный и этерифицированный холестерин и в конечном итоге превращаются в пенные клетки, секретирующие различные факторы роста и митогены, способствующие развитию атеросклеротического поражения сосуда [31]. Провоспалительная активация эндотелия обуславливается двумя ключевыми процессами – связывание рецепторов лейкоцитов с соответствующими рецепторами на поверхности эндотелиальных клеток, приводящее к адгезии клеток мононуклеарной фракции крови к эндотелиальному монослою; и повышенная секреция эндотелиальными клетками провоспалительных цитокинов [32]. В нашем эксперименте ММС-индуцированный генотоксический стресс у нормолипидемических крыс линии Wistar (подтвержденный результатами цитогенетического анализа ПХЭ) был ассоциирован с повышением экспрессии трех из четырех маркерных генов, кодирующих как рецепторы эндотелиальных клеток для лейкоцитов (*Vcam1*, *Icam1* и *Selp*), так и эндотелиальные провоспалительные цитокины (*Il6*, *Ccl2* и *Cxcl1*) в смывах эндотелиального монослоя нисходящей аорты. Эти данные свидетельствуют о выраженной провоспалительной активации эндотелия у лабораторных животных. Известно, что клеточный ответ на генотоксический стресс заключается в остановке клеточного цикла, запуске репарации ДНК и активации сигнальных путей p53 и NF-κB, играющих ключевую роль в репарации ДНК и воспалительном ответе соответственно [33]. Интересно, что активация пути NF-κB в результате действия на клетки алкилирующих агентов (например, ионизирующей радиации) может выступать индуктором таких антиапоптотических генов, как *BCL2L1*, *XIAP*, *CIAP1*, *CIAP2* и *BIRC5*, что приводит к увеличению выживаемости экспонированных клеток [34–37]. Кроме того, показано, что ММС может воздействовать на MAPK-путь, что приводит к увеличению уровня экспрессии провоспалительных цитокинов фибробластами [38]. Согласно современным концепциям, воспаление может являться ранним сигналом повреждения генетического материала клетки [39, 40], что позволяет рассматривать повреждение ДНК как своеобразный DAMP (damage-associated molecular pattern) [41]. Таким образом, обнаруженная в нашем эксперименте ассоциированная с генотоксическим стрессом провоспалительная активация эндотелиальных клеток нисходящей аорты нормолипидемических крыс линии Wistar является, с одной стороны, нормальной физиологической реакцией клеток на повреждение ДНК, а с другой стороны – одним из патофизиологических звеньев атерогенеза. Интересно, что в нашем эксперименте обнаружено снижение экспрессии гена *Mif*, кодирующего фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF) в ответ на генотоксический стресс, на фоне повышения экспрессии других генов, кодирующих вовлеченные в провоспалительную активацию эндотелия белки. В ряде исследований показано, что MIF, помимо своей провоспалительной активности, способен блокировать p53-зависимый апоптоз и стимулировать онкогенез, при этом данные факторы в клетке функционально противодействуют друг другу (активация пути p53 сопро-

ждается снижением экспрессии MIF) [42–45]. Таким образом, обнаруженное в нашем эксперименте снижение экспрессии гена *Mif* является, вероятно, следствием ММС-индуцированной активации пути p53.

Еще одним немаловажным признаком эндотелиальной дисфункции является нарушение эндотелиальной механотрансдукции – процесса трансформации механического воздействия потока в биохимические сигналы в эндотелиальных клетках. Данный процесс играет чрезвычайно важную роль в физиологии эндотелия, так как обуславливает дифференциальную чувствительность различных сосудов к атеросклерозу в зависимости от гидродинамических характеристик тока крови (турбулентный и ламинарный поток) [28, 29, 32]. Передача сигналов от механосенсоров в клетке осуществляется посредством большого количества молекул, в число которых входят и атеропротективные транскрипционные факторы KLF2, KLF4 и NRF2 [46–51], кодируемые генами *Klf2*, *Klf4* и *Nfe2l2* соответственно. В нашем эксперименте было обнаружено снижение экспрессии генов *Klf2* и *Klf4* в эндотелии аорты крыс линии Wistar в ответ на их экспозицию ММС, в то время как экспрессия гена *Nfe2l2* не изменялась относительно контроля. Атеропротективные свойства KLF2 обусловлены его способностью индуцировать экспрессию эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) – важного регулятора сосудистого гомеостаза – путем прямого связывания ее промотора в ответ на биомеханические стимулы. Кроме того, KLF2 способен ингибировать индукцию молекул клеточной адгезии VCAM-1 и SELE, вызванную действием на эндотелиальные клетки различных провоспалительных цитокинов, что приводит к ослаблению адгезии мононуклеарной фракции крови к эндотелию [52]. Показано, что данный транскрипционный фактор также может регулировать активность таких генов, участвующих в регуляции тонуса сосудов, как *ACE*, *EDN* и *ADM* [53]. Сходными эффектами обладает и другой транскрипционный фактор KLF4, который способен воздействовать на путь NF-κB, тем самым снижая экспрессию провоспалительных молекул. Он также способен связываться с коактиватором транскрипции p300, усиливая экспрессию eNOS и тромбомодулина [48]. Также было показано, что атеропротективный ламинарный тип напряжения сдвига способен индуцировать KLF4 и KLF2 посредством активации сигнального пути MEK5/MEF2 [54]. Таким образом, полученные в данном исследовании данные о снижении экспрессии атеропротективных транскрипционных факторов позволяют говорить о нарушении эндотелиальной механотрансдукции, ассоциированной с ММС-индуцированным генотоксическим стрессом.

В нашем эксперименте не удалось обнаружить дифференциальную экспрессию генов, регулирующих такие критерии эндотелиальной дисфункции, как эндотелиально-мезенхимальный переход и нарушение синтеза оксида азота. Следует отметить, что данные процессы характеризуют поздние стадии развития дисфункции эндотелия и достаточно сложно регистрируются на начальных этапах патологического изменения эндотелия. Их моделирование в эксперименте *in vivo* требует пролонгированной экспозиции лабораторных животных теми или иными триггерами эндотелиальной дисфункции, что в случае с использованием мутагенных агентов не всегда допустимо, так как способно привести к гибели животного в связи с критической дисфункцией различных органов и систем. Другим вероятным объяснением полученных результатов может служить особенность механизма действия ММС как триггера эндотелиальной дисфункции, который в первую очередь воздействует на сигнальные пути, вовлеченные в воспалительный ответ и внутриклеточный сигналинг.

Одним из новых критериев дисфункции эндотелия, рассматриваемым главным образом в контексте COVID-19, является протромботическая активация эндотелия, сопровождаемая повышением экспрессии фактора фон Виллебранда (vWF) и ингибитора активатора плазминогена (PAI-1) с одновременным снижением экспрессии активаторов плазминогена uPA и tPA [55–57]. В нашем эксперименте в эндотелии нисходящей аорты крыс линии Wistar, экспонированных ММС, был обнаружен только один ген

*Serpine1* (кодирующий PAI-1), экспрессия которого соответствовала референсной панели дисфункции эндотелия (характер экспрессии остальных генов был диаметрально противоположен референсу), что не позволяет с уверенностью говорить о протромботической активации эндотелия в ответ на генотоксический стресс у лабораторных животных. В силу относительной новизны данного критерия дисфункции эндотелия и отсутствия достаточного пула экспериментальных данных интерпретация полученных в настоящем исследовании результатов затруднена и требует дополнительных механизмов изучения, лежащих в основе изменения экспрессии генов-маркеров протромботической активации эндотелия в ответ на генотоксический стресс.

Таким образом, ММС-индуцированный генотоксический стресс у нормолипидемических крыс линии Wistar ассоциирован с нарушением двух ключевых звеньев патогенеза эндотелиальной дисфункции (провоспалительная активация эндотелия и нарушение эндотелиальной механотрансдукции) и может рассматриваться в качестве одного из ее триггеров.

#### ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (М. Ю. С.), проведение экспериментов (А. В. С., М. В. Х., М. А. А., Д. К. Ш., А. О. П.), обработка данных (М. Ю. С.), написание манускрипта (М. Ю. С.), редактирование рукописи (А. В. П.), окончательное утверждение текста рукописи (М. Ю. С., А. В. С., М. В. Х., М. А. А., Д. К. Ш., А. О. П., А. В. П.).

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств гранта Российского научного фонда № 21-75-10052 «Молекулярные механизмы развития эндотелиальной дисфункции в ответ на генотоксический стресс», <https://rscf.ru/project/21-75-10052/>. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Научно-исследовательского института комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (протокол № 05 от 13 апреля 2021 г.).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *GBD 2017* (2018) Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 392: 1736–1788. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32203-7)
2. *Mathers CD, Loncar D* (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 3: e442. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030442>
3. *Bertani F, Di Francesco D, Corrado MD, Talmon M, Fresu LG, Boccafroschi F* (2021) Paracrine Shear-Stress-Dependent Signaling from Endothelial Cells Affects Downstream Endothelial Function and Inflammation. *Int J Mol Sci* 22: 13300 <https://doi.org/10.3390/ijms222413300>
4. *Feldman CL, Stone PH* (2000) Intravascular hemodynamic factors responsible for progression of coronary atherosclerosis and development of vulnerable plaque. *Curr Opin Cardiol* 15: 430–440. <https://doi.org/10.1097/00001573-200011000-00010>
5. *Douglas G, Channon KM* (2014) The pathogenesis of atherosclerosis. *Medicine* 42: 480–484. <https://doi.org/10.1016/j.mpmmed.2014.06.011>

6. *Kutikhin AG, Sinitsky MY, Ponasenko AV* (2017) The role of mutagenesis in atherosclerosis. *Complex Issues Cardiovasc Diseases* 6: 92–101.  
<https://doi.org/10.17802/2306-1278-2017-1-92-101>
7. *Sinitsky MY, Kutikhin AG, Tsepokina AV, Shishkova DK, Asanov MA, Yuzhalin AE, Minina VI, Ponasenko AV* (2020) Mitomycin C induced genotoxic stress in endothelial cells is associated with differential expression of proinflammatory cytokines. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 858–860: 503252.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503252>
8. *Sinitsky MY, Tsepokina AV, Kutikhin AG, Shishkova DK, Ponasenko AV* (2021) The gene expression profile in endothelial cells exposed to mitomycin C. *Biochemistry (Moscow) Suppl Ser B: Biomed Chem* 15: 255–261.  
<https://doi.org/10.1134/S1990750821030100>
9. *Sinitsky MY, Sinitskaya AV, Shishkova DK, Ponasenko AV* (2022). Genotoxic stress leads to the proinflammatory response of endothelial cells: an *in vitro* study. *Biom Khim* 68: 361–366.  
<https://doi.org/10.18097/PBMC20226805361>
10. *Lee YJ, Park SJ, Ciccone SL, Kim CR, Lee SH* (2006) An *in vivo* analysis of MMC-induced DNA damage and its repair. *Carcinogenesis* 27: 446–453.  
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgi254>
11. *Rosefort C, Fauth E, Zankl H* (2004) Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis* 19: 277–284.  
<https://doi.org/10.1093/mutage/geh028>. PMID: 15215326
12. *Rink SM, Lipman R, Alley SC, Hopkins PB, Tomasz M* (1996) Bending of DNA by the mitomycin C-induced, GpG intrastrand cross-link. *Chem Res Toxicol* 9: 382–389.  
<https://doi.org/10.1021/tx950156q>
13. *Caulfield JL, Wishnok JS, Tannenbaum SR* (2003) Nitric oxide-induced interstrand cross links in DNA. *Chem Res Toxicol* 16: 571–574.  
<https://doi.org/10.1021/tx020117w>
14. *Colis LC, Raychaudhury P, Basu AK* (2008) Mutational specificity of gamma-radiation-induced guanine-thymine and thymine-guanine intrastrand cross-links in mammalian cells and translesion synthesis past the guanine-thymine lesion by human DNA polymerase  $\epsilon$ . *Biochemistry* 47: 8070–8079.  
<https://doi.org/10.1021/bi800529f>
15. *Stone MP, Cho YJ, Huang H, Kim HY, Kozekov ID, Kozekova A, Wang H, Minko IG, Lloyd RS, Harris TM, Rizzo CJ* (2008) Interstrand DNA cross-links induced by alpha, beta-unsaturated aldehydes derived from lipid peroxidation and environmental sources. *Acc Chem Res* 41: 793–804.  
<https://doi.org/10.1021/ar700246x>
16. *Cadet J, Davies KJA, Medeiros MH, Di Mascio P, Wagner JR* (2017) Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA. *Free Radic Biol Med* 107: 13–34.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.049>
17. *Adikesavan AK, Barrios R, Jaiswal AK* (2007) *In vivo* role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in metabolic activation of mitomycin C and bone marrow cytotoxicity. *Cancer Res* 67(17): 7966–7971.  
<https://doi.org/10.1158/0008-5472>
18. *Cammerer Z, Elhajouji A, Suter W* (2007) *In vivo* micronucleus test with flow cytometry after acute and chronic exposures of rats to chemicals. *Mutat Res* 626: 26–33.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.08.004>
19. *Asanov MA, Sinitsky MY, Shishkova DK, Sinitskaya AV, Khutornaya MV, Poddubnyak AO, Ponasenko AV* (2023) Dose-Response Assessment of Mitomycin C Genotoxic Effect on ApoE Knockout Mice. *J Evol Biochem Physiol* 59: 1693–1699.  
<https://doi.org/10.1134/S0022093023050198>
20. *Schmid W* (1973) Chemical mutagen testing on *in vivo* somatic mammalian cells. *Agents Actions* 3: 77–85.  
<https://doi.org/10.1007/BF01986538>
21. *Jain AK, Pandey AK* (2019) *In Vivo* Micronucleus Assay in Mouse Bone Marrow. *Methods Mol Biol* 2031: 135–146.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9646-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9646-9_7)
22. *Kutikhin AG, Shishkova DK, Velikanova EA, Sinitsky MY, Sinitskaya AV, Markova VE* (2022) Endothelial dysfunction in the context of blood-brain barrier modeling. *J Evol Biochem Physiol* 58: 781–806.  
<https://doi.org/10.1134/S0022093022030139>

23. *Nam D, Ni CW, Rezvan A, Suo J, Budzyn K, Llanos A, Harrison D, Giddens D, Jo H* (2009) Partial carotid ligation is a model of acutely induced disturbed flow, leading to rapid endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H1535–H1543.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00510.2009>
24. *Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Roy NV, De Paepe A, Speleman F* (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3(7): research0034.1.  
<https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
25. *Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT* (2009) The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611–622.  
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
26. *O’Riordan E, Chen J, Brodsky SV, Smirnova I, Li H, Goligorsky MS* (2005) Endothelial cell dysfunction: the syndrome in making. *Kidney Int* 67(5): 1654–1658.  
<https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00256.x>
27. *Chen PY, Qin L, Baeyens N, Li G, Afolabi T, Budatha M, Tellides G, Schwartz MA, Simons M* (2015) Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression. *J Clin Invest* 125(12): 4514–4528.  
<https://doi.org/10.1172/JCI82719>
28. *Cahill PA, Redmond EM* (2016) Vascular endothelium – Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis* 248: 97–109.  
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007>
29. *Gimbrone MA Jr, Garcia-Cardena G* (2016) Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* 118(4): 620–636.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301>
30. *Souilhol C, Harmsen MC, Evans PC, Krenning G* (2018) Endothelial-mesenchymal transition in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 114(4): 565–577.  
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvx253>
31. *Hartman J, Frishman WH* (2014) Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy. *Cardiol Rev* 22: 147–151.  
<https://doi.org/10.1097/CRD.0000000000000021>
32. *Jensen HA, Mehta JL* (2016) Endothelial cell dysfunction as a novel therapeutic target in atherosclerosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 14: 1021–1033.  
<https://doi.org/10.1080/14779072.2016.1207527>
33. *Sabatel H, Pirlot C, Piette J, Habraken Y* (2011) Importance of PIKKs in NF- $\kappa$ B activation by genotoxic stress. *Biochem Pharmacol* 82: 1371–1383.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.105>
34. *Habraken Y, Piette J* (2006) NF-kappaB activation by double-strand breaks. *Biochem Pharmacol* 72: 1132–1141.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.07.015>
35. *Janssens S, Tschopp J* (2006) Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response. *Cell Death Differ* 13: 773–784.  
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401843>
36. *Ahmed KM, Li JJ* (2007) ATM-NF-kappaB connection as a target for tumor radiosensitization. *Curr Cancer Drug Targets* 7: 335–342.  
<https://doi.org/10.2174/156800907780809769>
37. *Wu ZH, Miyamoto S* (2007) Many faces of NF-kappaB signaling induced by genotoxic stress. *J Mol Med (Berl)* 85: 1187–1202.  
<https://doi.org/10.1007/s00109-007-0227-9>
38. *Chou SF, Chang SW, Chuang JL* (2007) Mitomycin C upregulates IL-8 and MCP-1 chemokine expression via mitogen-activated protein kinases in corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 2009–2016.  
<https://doi.org/10.1167/iovs.06-0835>
39. *Cohen I, Rider P, Vornov E, Tomas M, Tudor C, Wegner M, Brondani L, Freudenberg M, Mittler G, Ferrando-May E, Dinarello CA, Apte RN, Schneider R* (2015) IL-1 $\alpha$  is a DNA damage sensor linking genotoxic stress signaling to sterile inflammation and innate immunity. *Sci Rep* 5: 14756.  
<https://doi.org/10.1038/srep14756>



40. *Cohen I* (2016) DNA damage talks to inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 33: 35–39.  
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.11.002>
41. *Poliezhhaieva T, Ermolaeva MA* (2017) DNA damage in protective and adverse inflammatory responses: Friend of foe? *Mech Ageing Dev* 165(Pt A): 47–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.06.004>
42. *Hudson JD, Shoabi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH* (1999) A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med* 190: 1375–1382.  
<https://doi.org/10.1084/jem.190.10.1375>
43. *Fingerle-Rowson G, Petrenko O* (2007) MIF coordinates the cell cycle with DNA damage checkpoints. Lessons from knockout mouse models. *Cell Div* 2: 22.  
<https://doi.org/10.1186/1747-1028-2-22>
44. *Nemajerova A, Mena P, Fingerle-Rowson G, Moll UM, Petrenko O* (2007) Impaired DNA damage checkpoint response in MIF-deficient mice. *EMBO J* 26: 987–997.  
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601564>
45. *Nemajerova A, Moll UM, Petrenko O, Fingerle-Rowson G* (2007) Macrophage migration inhibitory factor coordinates DNA damage response with the proteasomal control of the cell cycle. *Cell Cycle* 6: 1030–1034.  
<https://doi.org/10.4161/cc.6.9.4163>
46. *Parmar KM, Larman HB, Dai G, Zhang Y, Wang ET, Moorthy SN, Kratz JR, Lin Z, Jain MK, Gimbrone MA Jr, Garcia-Cardena G* (2006) Integration of flow-dependent endothelial phenotypes by Kruppel-like factor 2. *J Clin Invest* 116: 49–58.  
<https://doi.org/10.1172/JCI24787>
47. *Zakkar M, Van der Heiden K, Luong le A, Chaudhury H, Cuhlmann S, Hamdulay SS, Krams R, Edirisinghe I, Rahman I, Carlsen H, Haskard DO, Mason JC, Evans PC* (2009) Activation of Nrf2 in endothelial cells protects arteries from exhibiting a proinflammatory state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 1851–1857.  
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.193375>
48. *Zhou G, Hamik A, Nayak L, Tian H, Shi H, Lu Y, Sharma N, Liao X, Hale A, Boerboom L, Feaver RE, Gao H, Desai A, Schmaier A, Gerson SL, Wang Y, Atkins GB, Blackman BR, Simon DI, Jain MK* (2012) Endothelial Kruppel-like factor 4 protects against atherothrombosis in mice. *J Clin Invest* 122: 4727–4731.  
<https://doi.org/10.1172/JCI66056>
49. *Davies PF, Civelek M, Fang Y, Fleming I* (2013) The atherosusceptible endothelium: endothelial phenotypes in complex haemodynamic shear stress regions in vivo. *Cardiovasc Res* 99: 315–327.  
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvt101>
50. *Nakajima H, Mochizuki N* (2017) Flow pattern-dependent endothelial cell responses through transcriptional regulation. *Cell Cycle* 16: 1893–1901.  
<https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1364324>
51. *Lazaro I, Lopez-Sanz L, Bernal S, Oguiza A, Recio C, Melgar A, Jimenez-Castilla L, Egido J, Madrigal-Matute J, Gomez-Guerrero C* (2018) Nrf2 Activation Provides Atheroprotection in Diabetic Mice Through Concerted Upregulation of Antioxidant, Anti-inflammatory, and Autophagy Mechanisms. *Front Pharmacol* 9: 819.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00819>
52. *SenBanerjee S, Lin Z, Atkins GB, Greif DM, Rao RM, Kumar A, Feinberg MW, Chen Z, Simon DI, Lusinskas FW, Michel TM, Gimbrone MA Jr, Garcia-Cardena G, Jain MK* (2004) KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. *J Exp Med* 199: 1305–1315.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20031132>
53. *Dekker RJ, van Thienen JV, Rohlena J, de Jager SC, Elderkamp YW, Seppen J, de Vries CJ, Biessen EA, van Berkel TJ, Pannekoek H, Horrevoets AJ* (2005) Endothelial KLF2 links local arterial shear stress levels to the expression of vascular tone-regulating genes. *Am J Pathol* 167: 609–618.  
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63002-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63002-7)
54. *Villarreal G Jr, Zhang Y, Larman HB, Gracia-Sancho J, Koo A, Garcia-Cardena G* (2010) Defining the regulation of KLF4 expression and its downstream transcriptional targets in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 391: 984–989.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.002>
55. *Libby P, Luscher T* (2020) COVID-19 is, in the end, an endothelial disease. *Eur Heart J* 41: 3038–3044.  
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa623>
56. *Fogarty H, Townsend L, Morrin H, Ahmad A, Comerford C, Karampini E, Englert H, Byrne M, Bergin C, O'Sullivan JM, Martin-Loeches I, Nadarajan P, Bannan C, Mallon PW, Curley GF, Preston RJS, Rehill AM, McGonagle D, Ni Cheallaigh C, Baker RI, Renne T, Ward SE,*

O'Donnell JS, Irish COVID-19 Vasculopathy Study (iCVS) investigators (2021) Persistent endotheliopathy in the pathogenesis of long COVID syndrome. *J Thromb Haemost* 19: 2546–2553.

<https://doi.org/10.1111/jth.15490>

57. Gorog DA, Storey RF, Gurbel PA, Tantry US, Berger JS, Chan MY, Duerschmied D, Smyth SS, Parker WAE, Ajjan RA, Vilahur G, Badimon L, Berg JMT, Cate HT, Peyvandi F, Wang TT, Becker RC (2022) Current and novel biomarkers of thrombotic risk in COVID-19: a Consensus Statement from the International COVID-19 Thrombosis Biomarkers Colloquium. *Nat Rev Cardiol* 19: 475–495.

<https://doi.org/10.1038/s41569-021-00665-7>

## **Genotoxic Stress is a Trigger of Endothelial Dysfunction in Wistar Rats: Results of a Molecular Genetic Study**

**M. Yu. Sinitsky<sup>a,\*</sup>, A. V. Sinitskaya<sup>a</sup>, M. V. Khutornaya<sup>a</sup>, M. A. Asanov<sup>a</sup>,  
D. K. Shishkova<sup>a</sup>, A. O. Poddubnyak<sup>a</sup>, and A. V. Ponasenko<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

\*e-mail: [max-sinitsky@rambler.ru](mailto:max-sinitsky@rambler.ru)

Atherosclerosis and coronary artery disease are the leading causes of disability and mortality among the population. Genotoxic stress can be considered as a new trigger of endothelial dysfunction underlying the pathogenesis of these diseases. This research was aimed to the study of molecular genetic markers of endothelial dysfunction associated with genotoxic stress in normolipidemic Wistar rats. Male Wistar rats that received tail vein injections of the alkylating mutagen mitomycin C (MMC) at the dosage of 0.5 mg/kg body weight (experimental group) or 0.9% NaCl solution (control group) three times a week for a month were included in the presented study. Genotoxic stress in animals was assessed using a micronucleus assay in polychromatophilic erythrocytes (PCE); endothelial dysfunction was identified by assessing the expression of the *Vcam1*, *Icam1*, *Sele*, *Selp*, *Il6*, *Ccl2*, *Cxcl1*, *Mif*, *Vwf*, *Serpine1*, *Plau*, *Plat*, *Klf2*, *Klf4*, *Nfe2l2*, *Nos3*, *Snai1*, *Snai2*, *Twist1*, *Zeb1*, *Cdh5* and *Cdh2* genes in the endothelial monolayer of the descending aorta. It was found that rats from the experimental group are characterized by pronounced genotoxic stress, as evidenced by a more than threefold increased frequency of micronucleated PCE and a decreased proportion of PCE in the total pool of analyzed erythrocytes. Gene expression profiling showed that rats included in the experimental group are characterized by pro-inflammatory activation of endothelium, accompanied by increased expression of the *Vcam1*, *Icam1*, *Selp*, *Il6*, *Ccl2* and *Cxcl1* genes, as well as impaired endothelial mechanotransduction, characterized by decreased expression of the *Klf2* and *Klf4* genes. Thus, MMC-induced genotoxic stress in normolipidemic Wistar rats is associated with impaired two key links of the pathogenesis of endothelial dysfunction and can be considered as one of its triggers.

**Keywords:** DNA damage, mutagenesis, atherogenesis, endothelium, micronucleus assay, gene expression, mRNA