

<https://doi.org/10.29001/2073-8552-2022-37-3-121-127>
УДК: 577.152.1:611-018.74:57.086.83

Уровень оксидативного стресса в эндотелиальных клетках, культивируемых в присутствии митомицина С

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

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,
650002, Российская Федерация, Кемерово, Сосновый б-р, 6

Аннотация

Обоснование. Атеросклероз – одна из ведущих патологий сердечно-сосудистой системы. Показано, что одним из факторов риска данного заболевания является повреждение ДНК эндотелиальных клеток, приводящее к эндотелиальной дисфункции и вызванное воздействием на клетки мутагена митомицина С (ММС). ММС оказывает алкилирующее действие на ДНК и вовлечен в процесс формирования оксидативного стресса, также являющегося фактором риска развития атеросклероза.

Цель исследования: оценить уровень маркеров оксидативного стресса в культурах первичных эндотелиальных клеток человека, экспонированных мутагеном алкилирующего механизма действия ММС.

Материал и методы. Материалом исследования послужили коммерческие культуры первичных эндотелиальных клеток коронарной (НСАЕС) и внутренней грудной (НТАЕС) артерий человека, культивируемые в присутствии 500 нг/мл ММС (экспериментальная группа) и без мутагенной нагрузки (контрольная группа). Уровень активных форм кислорода, азота и 8-ОН-дезоксигуанозина (8-ОНдГ) определяли в культуральной среде методом иммуноферментного анализа (ИФА). Относительную длину теломерных участков ДНК эндотелиальных клеток, а также экспрессию генов *TERT* и *POT1* оценивали с помощью метода количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени. Статистическую обработку результатов исследования проводили в программе GraphPad Prism 9.

Результаты. В результате проведенной работы установлено, что концентрация активных форм кислорода, реактивных форм азота (NO_2^- , NO_3^- , $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) и 8-ОНдГ статистически значимо не различалась в экспериментальной и контрольной группах клеток НСАЕС и НТАЕС. При этом в экспонированных ММС клетках НСАЕС и НТАЕС отмечено уменьшение относительной длины теломерных участков ДНК по сравнению с неэкспонированным контролем (10,97 против 27,03 в клетках НСАЕС, $p = 0,002$ и 9,12 против 25,64 в клетках НТАЕС, $p = 0,001$). Кроме того, в экспонированных ММС клетках НСАЕС установлено 1,75-кратное повышение экспрессии гена *POT1* относительно контроля ($p = 0,019$). Ген *TERT* не экспрессировался ни в одной из изученных групп.

Заключение. Мутаген алкилирующего механизма действия ММС в эксперименте *in vitro* не вызывает выраженный оксидативный стресс в культурах первичных эндотелиальных клеток человека. Формирование эндотелиальной дисфункции, ассоциированной с экспозицией клеток ММС, обусловлено, главным образом, генотоксическим стрессом, связанным с алкилированием ДНК эндотелиальных клеток.

Ключевые слова:	эндотелиальная дисфункция, оксидативный стресс, мутагенез, атерогенез, теломеры, теломераза.
Конфликт интересов:	авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Прозрачность финансовой деятельности:	исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-75-10052 «Молекулярные механизмы развития эндотелиальной дисфункции в ответ на генотоксический стресс», https://rscf.ru/project/21-75-10052/ .
Для цитирования:	Синицкий М.Ю., Синицкая А.В., Шишкова Д.К., Асанов М.А., Хуторная М.В., Понасенко А.В. Уровень оксидативного стресса в эндотелиальных клетках, культивируемых в присутствии митомицина С. <i>Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины</i> . 2022;37(3):121–127. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2022-37-3-121-127 .

Oxidative stress in the endothelial cell culture exposed to mitomycin C

Maxim Yu. Sinitsky, Anna V. Sinitskaya, Daria K. Shishkova, Maxim A. Asanov,
Maria V. Khutornaya, Anastasia V. Ponasenko

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases,
6, Sosnovy blvd, Kemerovo, 650002, Russian Federation

Abstract

Background. Atherosclerosis is one of the leading cardiovascular pathologies. Evidence suggests that DNA damage caused by endothelial cell exposure to mitomycin C (MMC) leads to endothelial dysfunction and is the risk factor for this disease. MMC is an alkylating mutagen involved in the development of oxidative stress, which is also a risk factor for atherosclerosis.

Aim. To assess the levels of oxidative stress markers in the primary human endothelial cell culture exposed to alkylating mutagen MMC.

Material and Methods. Commercially available primary cultures of endothelial cells obtained from human coronary artery (HCAEC) and human internal thoracic artery (HITAEC) were used in the study. The cells were cultivated in the presence of 500 ng/mL MMC (experimental group) and without mutagenic load (control group).

The levels of reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and 8-OH-deoxyguanosine (8-OHdG) in cell growth media were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay. The relative telomere length and expression of *TERT* and *POT1* genes were assessed in endothelial cells by quantitative polymerase chain reaction. Statistical analysis of data was performed using GraphPad Prism 9 software.

Results. There were no differences in the concentrations of reactive oxygen species, reactive nitrogen species (NO_2^- , NO_3^- , $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$), and 8-OHdG in HCAEC and HITAEC cultures exposed to MMC compared to the corresponding parameters in the non-exposed controls. At the same time, HCAEC and HITAEC exposed to MMC were characterized by a decrease in the relative telomere length compared to control (10.97 vs. 27.03 in HCAEC, $p = 0.002$ and 9.12 vs. 25.64 in HITAEC, $p = 0.001$). Moreover, we discovered 1.75-fold increase in the expression of *POT1* gene in the experimental HCAEC compared to control ($p = 0.019$). No expression of *TERT* gene was observed in study groups.

Conclusions. Alkylating mutagen MMC did not induce any pronounced oxidative stress in the primary human endothelial cells *in vitro*. The development of endothelial dysfunction caused by MMC exposure was triggered mainly by DNA alkylation resulting in the genotoxic stress in the endothelial cells.

Keywords:	endothelial dysfunction, oxidative stress, mutagenesis, atherogenesis, telomere, telomerase.
Conflict of interest:	the authors do not declare a conflict of interest.
Financial disclosure:	the study was supported by the Grant of Russian Science Foundation No. 21-75-10052 "Molecular mechanisms of genotoxic stress induced endothelial dysfunction", https://rscf.ru/project/21-75-10052/ .
For citation:	Sinitsky M.Yu., Sinitskaya A.V., Shishkova D.K., Asanov M.A., Khutornaya M.V., Ponasenko A.V. Oxidative stress in the endothelial cell culture exposed to mitomycin C. <i>The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine</i> . 2022;37(3):121–127. https://doi.org/10.29001/2073-8552-2022-37-3-121-127 .

Введение

Согласно статистике, патологии сердечно-сосудистой системы на настоящий момент занимают лидирующую позицию в структуре заболеваемости и смертности как во всем мире, так и в России, с тенденцией к росту в 2030 г. до 23 млн случаев. При этом причиной абсолютного большинства смертей среди всех патологий сердечно-сосудистого континуума является атеросклероз [1], представляющий собой мультифакторное воспалительное заболевание, в основе которого лежит развитие эндотелиальной дисфункции, факторами риска которой является гиперхолестеремия, артериальная гипертензия, сахарный диабет, курение и ряд других [2]; обсуждается также роль повреждения ДНК в атерогенезе [3].

В последнее десятилетие активно изучалась связь между воспалением, оксидативным стрессом, мутагенезом и атерогенезом [3]. Так, известно, что некоторые факторы риска развития атеросклероза (например, сахарный диабет и курение), а также ряд экзогенных токсических веществ способствуют образованию активных форм кислорода в сосудистом русле, участвующих в атерогенезе [4]. Отмечается повышенный уровень ароматических ДНК-аддуктов, являющихся маркерами оксидативного стресса, в клетках атеросклеротических бляшек, таких как макрофаги, гладкомышечные и эндотелиальные клетки, по сравнению со здоровыми тканями [5]. В экспериментальных работах показано, что экспозиция культур первичных эндотелиальных клеток человека мутагеном

митомицином С (ММС) приводит к выраженному воспалительному ответу и развитию эндотелиальной дисфункции [6]. Известно, что ММС способен вызвать генотоксический стресс за счет образования поперечных сшивок молекулы ДНК в результате реакции N-алкилирования, что приводит в конечном итоге к нарушению процессов транскрипции, трансляции и гибели клеток путем апоптоза [7]. Кроме этого, ММС способен вызвать и оксидативный стресс за счет циклического одноэлектронного восстановления молекулы ММС с последующим окислением молекулярным кислородом, в результате чего образуется супероксидный радикал – чрезвычайно активная частица, относящаяся к активным формам кислорода. Активные формы кислорода оказывают повреждающее действие на различные типы биологических молекул, таких как ДНК, липиды и белки, что приводит к инактивации ферментов, повреждению ДНК, дисфункции и гибели клеток [8]. Таким образом, понимание ведущего механизма действия ММС на эндотелиальные клетки, приводящего к развитию эндотелиальной дисфункции, является чрезвычайно актуальным для современной сосудистой биологии и внесет вклад в понимание фундаментальных аспектов атерогенеза.

Цель исследования: оценить уровень маркеров оксидативного стресса в культурах первичных эндотелиальных клеток человека, экспонированных мутагеном алкилирующего механизма действия ММС.

Материал и методы

Материалом исследования послужили коммерческие культуры первичных эндотелиальных клеток коронарной (Human Coronary Artery Endothelial Cells, HCAEC) и внутренней грудной (Human Internal Thoracic Endothelial Cells, HITAEC) артерий (Cell Applications, США). Данные клеточные линии были выбраны в связи с их разной поражаемостью атеросклерозом: так, атеросклеротическое поражение коронарной артерии встречается наиболее часто, в том время как внутренняя грудная артерия практически не подвержена атеросклерозу [9]. Все работы с клеточными культурами проводили в асептических условиях. Клетки культивировали в условиях повышенной влажности, 5%-го содержания CO₂ и при температуре 37 °С в среде для роста клеток Human MesoEndo Cell Growth Medium (Cell Applications, США) до достижения 80% конfluence, после чего пересеивали в 6-луночные культуральные планшеты, содержащие по 2 мл среды для роста клеток в каждой лунке, и культивировали еще сутки. После окончания культивирования старую среду для роста клеток удаляли и приливали в каждую лунку 2 мл свежей среды, содержащей 500 нг/мл алкилирующего мутагена ММС (AppliChem, Испания) (экспериментальная группа) или 0,9% раствор NaCl (контрольная группа). Экспериментальные и контрольные планшеты культивировали в стандартных условиях в течение 6 ч, после этого проводили замену культуральной среды на чистую и культивировали клетки еще сутки, после чего выводили из эксперимента. Выбор концентрации ММС и времени культивирования в условиях мутагенной нагрузки был обусловлен имеющимися рекомендациями по моделированию мутагенеза *in vitro* и результатами собственных исследований [6].

Уровень активных форм кислорода (ROS), реактивных форм азота (NO₂⁻, NO₃⁻, NO₂⁻/NO₃⁻) и 8-ОН-дезоксигуанозина (8-ОНдГ) определяли в культуральной среде

методом иммуноферментного анализа (ИФА) коммерческими наборами Human ROS ELISA Kit (Novateinbio, США), Total Nitric Oxide and Nitrate/Nitrite Parameter Assay Kit (R&D Systems, США) и DNA Damage ELISA Kit (Enzo, США), соответственно. Оптическую плотность образцов измеряли с помощью микропланшетного спектрофотометра Multiskan Sky (Thermo Scientific, США) и переводили в концентрацию в соответствии с рекомендациями производителей наборов.

Относительная длина теломерных (ОДТ) участков ДНК оценивалась методом количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени с использованием SYBR Green праймеров, изготовленных компанией ЗАО «Евроген» (Москва, Россия). В качестве референса был использован ген *HBG1*. Характеристика праймеров, использованных для оценки ОДТ, представлена в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика праймеров, использованных для оценки относительной длины теломер

Table 1. Characteristics of primes used for relative telomere length assessment

Праймер Primer	Последовательность Sequence
<i>Telo</i>	F:GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGA GGGT R:TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA
<i>HBG1</i>	F:GCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGC R:CACCAACTTCATCCACGTTCCACC

Примечание: ОДТ – относительная длина теломер, F – прямой праймер, R – обратный праймер.

Note: RLT – relative telomere length, F – forward primer, R – reverse primer.

Из экспериментальных и контрольных клеток HCAEC и HITAEC выделяли геномную ДНК по стандартному протоколу фенол-хлороформной экстракции и оценивали ее качество на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). ПЦР проводили на амплификаторе ViiA 7 (Applied Biosystems, США) в 96-луночном планшете, включающем в себя изучаемые образцы, пять стандартов с двукратным разведением и отрицательный контроль, анализируемые в трех технических повторах. Для проведения амплификации на каждый образец готовили по 10 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл мастер-микса PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, США), по 500 нМ прямого и обратного праймеров (ЗАО «Евроген», Москва) и 5 мкл раствора геномной ДНК (либо деионизированной воды в случае с отрицательным контролем). Амплификацию проводили по следующей программе: 2 мин при 50 °С (1 цикл), 2 мин при 95 °С (1 цикл), 15 с при 95 °С и 60 с при 60 °С (40 циклов). ОДТ рассчитывалась по следующей формуле:

$$\text{ОДТ} = [2^{\text{Ct}(\text{Telo})} / 2^{\text{Ct}(\text{HBG1})}]^{-1} \quad [10].$$

Для оценки экспрессии генов *POT1* и *TERT* было проведено выделение общей РНК из эндотелиальных клеток при помощи коммерческого набора RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen, Германия) по протоколу производителя. Количество и чистота выделенной РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США), а ее качество – на флуориметре Qubit

4 (Invitrogen, США) путем оценки индекса RIQ (RNA Integrity and Quality) с использованием набора реагентов Qubit RNA IQ Assay Kit (Invitrogen, США). Далее на основе выделенной РНК с помощью реакции обратной транскрипции и набора High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США) была синтезирована молекула комплиментарной ДНК (кДНК). Генная экспрессия оценивалась с помощью метода кПЦР с использованием SYBR Green праймеров, изготовленных компанией ЗАО «Евроген» (Москва, Россия), на амплификаторе ViiA 7 (Applied Biosystems, США). Нормирование результатов ПЦР проводилось с помощью трех референсных генов на амплификаторе ViiA 7 (Applied Biosystems, США), таблица 2.

Таблица 2. Характеристика праймеров, использованных для оценки генной экспрессии

Table 2. Characteristics of primers used for gene expression assessment

Праймер Primer	Последовательность Sequence
<i>POT1</i>	F:GCAAAAAGGAGTATTCTAACAAACAG R:TCACGCTTACACCAAAATCG
<i>TERT</i>	F:TTTCTGGAGCTGGTTGGGAA R:GAAGAGCCTGAGCAGCTCGA
<i>HPRT1</i>	F:TTGCTTTCCTTGGTCAGGCA R:TCGTGGGGTCCTTTTCACCA
<i>GAPDH</i>	F:AGCCACATCGCTCAGACAC R:GCCAATACGACCAATCC
<i>B2M</i>	F:TCCATCCGACATTGAAGTTG R:CGGCAGGCATACTCATCTT

Примечание: F – прямой праймер, R – обратный праймер.

Note: F – forward primer, R – reverse primer.

Методика приготовления реакционной смеси и программа амплификации были аналогичны описанным в разделе по оценке ОДТ. Уровень экспрессии генов *POT1* и *TERT* рассчитывали по методу ΔC_t (Уровень экспрессии = 2^{Ct} [среднее геометрическое референсных генов] – C_t [ген интереса]) и выражали в виде условных единиц (у. е.). Оценку генной экспрессии проводили в строгом соответствии с существующими стандартами [11].

Статистический анализ результатов исследования выполняли в программе StatSoft STATISTICA 10. Для количественных показателей рассчитывали медиану (*m*) и межквартильный размах (IQR), сравнение двух независимых групп проводили с помощью *U*-критерия Манна – Уитни. Различия между группами считали статистически значимыми при значениях $p < 0,05$.

Результаты

В результате оценки уровня маркеров оксидативного стресса в клеточных культурах, таких как ROS, NO₂⁻, NO₃⁻, NO₂⁻/NO₃⁻ и 8-OHdG, не обнаружено статистически значимого изменения изученных показателей в клетках НСАЕС и НТАЕС, экспонированных ММС, по сравнению с контрольной группой (рис. 1).

Одновременно с этим в экспонированных ММС клетках НСАЕС и НТАЕС было отмечено уменьшение ОДТ по сравнению с неэкспонированным контролем (10,97 против 27,03 в клетках НСАЕС, $p = 0,002$ и 9,12 против 25,64 в клетках НТАЕС, $p = 0,001$). Кроме того, в клетках НСАЕС было обнаружено статистически значимое 1,75-кратное увеличение уровня экспрессии гена *POT1* (Protection Of

Telomeres 1) на уровне $p = 0,019$, в то время как в клетках НТАЕС данный ген экспрессировался на одинаковом уровне и в экспериментальной, и в контрольной группах (рис. 2). Ген *TERT* (Telomerase Reverse Transcriptase) в изученных клеточных культурах не экспрессировался.

Обсуждение

ММС представляет собой противоопухолевый антибиотик, широко использующийся в терапии различных типов рака, включая рак молочной железы, легкого, матки, желудка, мочевого пузыря и толстого кишечника [12]. Вместе с тем в клетках млекопитающих ММС вызывает критическое повреждение молекулы ДНК за счет реакции N-алкилирования, что приводит к нарушению процессов транскрипции, трансляции и, в конечном итоге, к гибели клетки путем апоптоза [7]. Кроме него алкилирующими агентами является целый ряд эндогенных (бифункциональные альдегиды – продукты перекисного окисления липидов и биосинтеза простагландинов; азотистая кислота – побочный продукт метаболизма нитритов и реакции воды и оксида азота; свободные радикалы) и экзогенных (компоненты пищевых добавок, пестицидов, табачного дыма, выхлопных газов и выбросов промышленных предприятий; ионизирующая радиация) факторов, при этом роль последних постоянно увеличивается в связи с развитием промышленности и ухудшением экологической обстановки.

Вместе с тем токсическое действие ММС на биологические молекулы, в том числе и на ДНК, может проявляться и посредством активации оксидативного стресса, в результате чего происходит образование гидроксильного радикала (·OH), который вовлечен в большинство путей оксидативного повреждения молекулы ДНК [13]. Образование ·OH зачастую сопровождается активацией NO-синтаз, стимулирующих образование оксида азота (·NO), который может взаимодействовать с анион-радикалом с образованием достаточно мощного окислителя пероксинитрита (ONOO·), относящегося к реактивным формам азота и также участвующего в повреждении ДНК [14]. Для оценки свободнорадикального повреждения ДНК наиболее часто используется такой маркер, как 8-OHdG [15].

В результате проведенного нами исследования в эндотелиальных клетках различных артерий, *in vitro* экспонированных мутагеном алкилирующего механизма действия ММС, не выявлено повышения активных форм кислорода, реактивных форм азота и 8-OHdG по сравнению с неэкспонированным контролем. Вместе с тем существующие исследования на моделях лабораторных животных показывают, что пораженная атеросклерозом аорта характеризуется уменьшением уровня оксидативных повреждений ДНК от интимы к адвентиции, при этом в интима уровень 8-OHdG в 2,8 раза выше, чем в меди, что объясняется хронической экспозицией эндотелиального монослоя сосудов мутагенами окружающей среды, циркулирующими в кровотоке [5].

Несмотря на отсутствие повышения уровня свободных радикалов в экспонированных ММС клеточных культурах, в нашем эксперименте было обнаружено значительное снижение ОДТ эндотелиальных клеток из экспериментальной группы. Длина теломер поддерживается за счет фермента теломеразы, кодируемого геном *TERT*. Показано, что изменение длины теломер ассоциировано с воспалением и оксидативным стрессом [16].

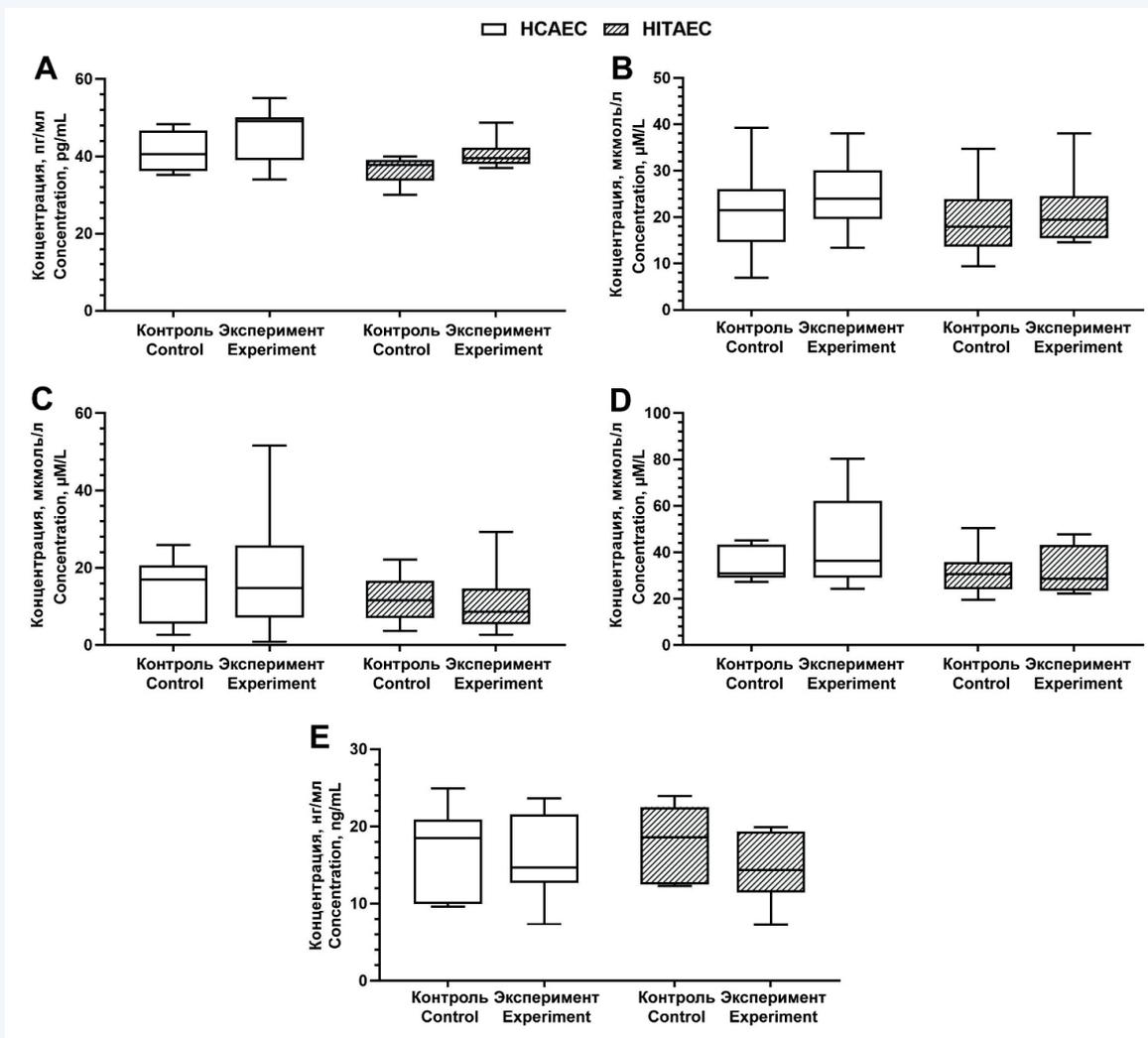


Рис. 1. Уровень маркеров оксидативного стресса в клеточных культурах (A – ROS, B – NO₂⁻, C – NO₃⁻, D – NO₂⁻/NO₃⁻, E – 8-OHdG)
 Fig. 1. Levels of oxidative stress markers in the studied cell cultures (A – ROS, B – NO₂⁻, C – NO₃⁻, D – NO₂⁻/NO₃⁻, E – 8-OHdG)

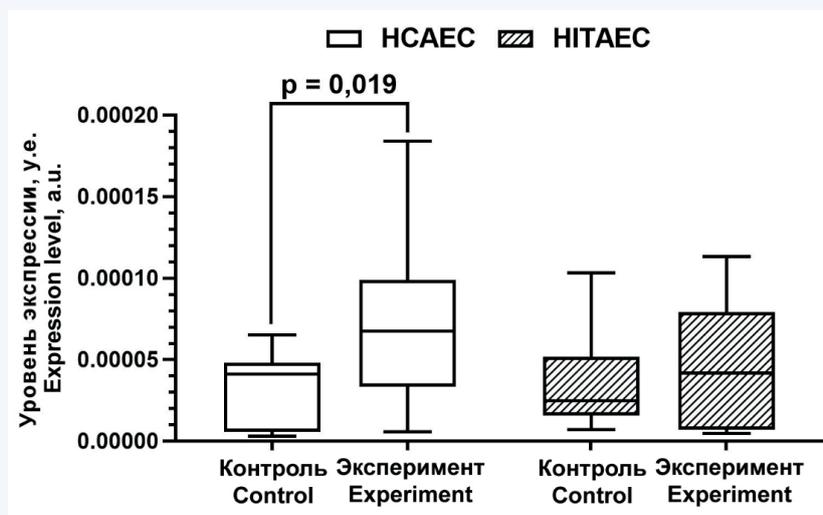


Рис. 2. Относительная экспрессия гена POT1
 Fig. 2. Relative expression of the POT1 gene

Оксидативный стресс способствует разрушению теломерных участков хромосом в процессе клеточного деления *in vitro* и также стимулирует выработку провоспалительных цитокинов [17]. Интересно, что в нашем эксперименте в экспонированных ММС эндотелиальных клетках наблюдается снижение ОДТ с одновременным отсутствием выраженного оксидативного стресса (уровень активных форм кислорода, реактивных форм азота и 8-OHdG в экспериментальной и контрольной группах находился на одном и том же уровне). Вероятным объяснением этого может служить деградация теломерных участков ДНК в результате прямого действия ММС, а также воздействие на теломеры провоспалительных цитокинов, активно синтезирующихся в результате экспозиции клеточных культур ММС и участвующих в клеточном старении, при котором также отмечается уменьшение длины теломер [18]. Наблюдаемое в экспонированных ММС клетках НСАЕС (более чувствительных к действию ММС в сравнении с клетками НТАЕС) повышение экспрессии гена *POT1*, кодирующего белок, защищающий теломеры от повреждения за счет подавления ATR-сигнального пути и привлечения теломеразы к теломерам для их восстановления [19], вероятно, является компенсаторным механизмом на действие мутагена, играющим важную физиологическую роль, заключающуюся

в поддержании стабильности хромосом эндотелиальных клеток, культивируемых в условиях генотоксической нагрузки. Необходимо отметить, что нам не удалось оценить экспрессию гена *TERT* в изученных группах, что, вероятно, связано с чрезвычайно низким уровнем экспрессии теломеразы в зрелых клетках [20].

Следует отметить, что представленное исследование имеет ряд ограничений. В частности, результаты, полученные в ходе эксперимента *in vitro*, должны быть проверены в экспериментах на лабораторных животных для того, чтобы смоделировать изучаемые эффекты не только в клеточных культурах, но и в условиях живого организма. Использование *in vivo* моделей позволит смоделировать хроническую экспозицию клеток мутагеном.

Заключение

В результате проведения исследования установлено, что мутаген алкилирующего механизма действия ММС в эксперименте *in vitro* не вызывает выраженный оксидативный стресс в культурах первичных эндотелиальных клеток человека. Формирование эндотелиальной дисфункции, ассоциированной с экспозицией клеток ММС, обусловлено, главным образом, генотоксическим стрессом, связанным с алкилированием ДНК эндотелиальных клеток.

Литература / References

- 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.
- Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature*. 2021;592(7855):524–533. DOI: 10.1038/s41586-021-03392-8.
- 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.
- Kutikhin A.G., Sinitsky M.Y., Ponasenko A.V. The role of mutagenesis in atherosclerosis. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2017;(1):92–101. (In Russ.). DOI: 10.17802/2306-1278-2017-1-92-101.
- Borghini A., Cervelli T., Galli A., Andreassi M.G. DNA modifications in atherosclerosis: From the past to the future. *Atherosclerosis*. 2013;230(2):202–209. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.07.038.
- 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.
- 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(3):130–136. DOI: 10.18097/PBMC20216702130.
- Sinitsky M.Y., Tsepokina A.V., Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Ponasenko A.V. The gene expression signature in endothelial cells exposed to mitomycin C. *Biomedical Chemistry*. 2021;67(3):130–136. (In Russ.). DOI: 10.18097/PBMC20216702130.
- 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):446–453. DOI: 10.1093/carcin/bgi254.
- Klaunig J.E., Wang Z., Pu X., Zhou S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2011;254(2):86–99. DOI: 10.1016/j.taap.2009.11.028.
- Sims F.H. A comparison of coronary and internal mammary arteries and implications of the results in the etiology of atherosclerosis. *Am. Heart J*. 1983;105(4):560–566.

Информация о вкладе авторов

Синицкий М.Ю. – формирование концепции и дизайна исследования, проведение экспериментов (выделение РНК, синтез кДНК), анализ результатов исследования, написание статьи, окончательное утверждение текста статьи.

- Cawthon R.M. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(10):e47. DOI: 10.1093/nar/30.10.e47.
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellems J., Huggett J., Kubista M. et al. 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.
- Gnad-Vogt S.U., Hofheinz R.D., Saussele S., Kreil S., Willer A., Willeke F. et al. Pegylated liposomal doxorubicin and mitomycin C in combination with infusional 5-fluorouracil and sodium folic acid in the treatment of advanced gastric cancer: Results of a phase II trial. *Anticancer Drugs*. 2005;16(4):435–440. DOI: 10.1097/00001813-200504000-00010.
- Cadet J., Davies K.J.A., Medeiros M.H., Di Mascio P., Wagner J.R. Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA. *Free Radic. Biol. Med*. 2017;107:13–34. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.049.
- Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J. Biol. Chem*. 2013;288(37):26464–26472. DOI: 10.1074/jbc.R113.472936.
- Shekaftik O.S., Nasirzadeh N. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) as a biomarker of oxidative DNA damage induced by occupational exposure to nanomaterials: A systematic review. *Nanotoxicology*. 2021;15(6):850–864. DOI: 10.1080/17435390.2021.1936254.
- Kiecolt-Glaser J.K., Epel E.S., Belury M.A., Andridge R., Lin J., Glaser R. et al. Omega-3 fatty acids, oxidative stress, and leukocyte telomere length: A randomized controlled trial. *Brain Behav. Immun*. 2013;28:16–24. DOI: 10.1016/j.bbi.2012.09.004.
- Lipcsey M., Söderberg E., Basu S., Larsson A., Sjölin J., Aström M. et al. F2-isoprostane, inflammation, cardiac function and oxygenation in the endotoxaemic pig. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 2008;78(3):209–217. DOI: 10.1016/j.plefa.2008.01.006.
- Wang L., Yu X., Liu J.P. Telomere damage response and low-grade inflammation. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2017;1024:213–224. DOI: 10.1007/978-981-10-5987-2_10.
- Aramburu T., Plucinsky S., Skordalakes E. POT1-TPP1 telomere length regulation and disease. *Comput. Struct. Biotechnol. J*. 2020;18:1939–1946. DOI: 10.1016/j.csbj.2020.06.040.
- Zvereva M.I., Shcherbakova D.M., Dontsova O.A. Telomerase: Structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry (Mosc.)*. 2010;75(13):1563–1583. DOI: 10.1134/s0006297910130055.

Information on author contributions

Sinitsky M.Yu. – study concept, study design, performing the experiments (RNA isolation, cDNA synthesis), analysis of study results, writing the article, and final approval of the manuscript for publication.
Sinitskaya A.V. – performing the experiments (gene expression analysis),

Синицкая А.В. – проведение экспериментов (анализ геной экспрессии), написание статьи, окончательное утверждение текста статьи.

Шишкова Д.К. – работа с клеточными культурами (наращивание клеточной массы, контроль жизнеспособности клеточных культур на протяжении всего эксперимента), окончательное утверждение текста статьи.

Асанов М.А. – проведение экспериментов (оценка длины теломер), окончательное утверждение текста статьи.

Хуторная М.В. – поиск литературы, проведение экспериментов (анализ уровня маркеров оксидативного стресса), окончательное утверждение текста статьи.

Понасенко А.В. – формирование концепции и дизайна исследования, анализ результатов исследования, окончательное утверждение текста статьи.

writing the article, and final approval of the manuscript for publication.

Shishkova D.K. – working with cell cultures (cell growth, control of cell culture viability throughout the experiment) and final approval of the manuscript for publication.

Asanov M.A. – performing the experiments (telomere length assessment) and final approval of the manuscript for publication.

Khutornaya M.V. – literature search, performing the experiments (analysis of oxidative stress marker levels), and final approval of the manuscript for publication.

Ponassenko A.V. – study concept, study design, analysis of study results, and final approval of the manuscript for publication.

Сведения об авторах

Синицкий Максим Юрьевич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник, лаборатория геномной медицины, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-4824-2418.

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

Синицкая Анна Викторовна, канд. биол. наук, научный сотрудник, лаборатория геномной медицины, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-4467-8732.

E-mail: sepoav1991@gmail.com.

Шишкова Дарья Кирилловна, канд. биол. наук, научный сотрудник, лаборатория молекулярной, трансляционной и цифровой медицины, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-1518-3888.

E-mail: shishkovadk@gmail.com.

Асанов Максим Айдарович, младший научный сотрудник, лаборатория геномной медицины, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-0747-2495.

E-mail: asmaks988@gmail.com.

Хуторная Мария Владимировна, младший научный сотрудник, лаборатория геномной медицины, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, ORCID 0000-0002-9714-4080.

E-mail: masha_hut@mail.ru.

Понасенко Анастасия Валериевна, канд. мед. наук, заведующий лабораторией геномной медицины, отдел экспериментальной медицины, Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. ORCID 0000-0002-3002-2863.

E-mail: ponaav@kemcardio.ru.

 **Синицкий Максим Юрьевич**, e-mail: max-sinitsky@rambler.ru.

Information about the authors

Maxim Yu. Sinitsky, Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Scientist, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-4824-2418.

E-mail: sinitsky.maxim@gmail.com.

Anna V. Sinitskaya, Cand. Sci. (Biol.), Research Scientist, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-4467-8732.

E-mail: sepoav1991@gmail.com.

Daria K. Shishkova, Cand. Sci. (Biol.), Research Scientist, Laboratory of Molecular, Translational, and Digital Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-1518-3888.

E-mail: shishkovadk@gmail.com.

Maxim A. Asanov, Junior Research Scientist, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-0747-2495.

E-mail: asmaks988@gmail.com.

Maria V. Khutornaya, Junior Research Scientist, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-9714-4080.

E-mail: masha_hut@mail.ru.

Anastasia V. Ponassenko, Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases. ORCID 0000-0002-3002-2863.

E-mail: ponaav@kemcardio.ru.

 **Maxim Yu. Sinitsky**, e-mail: sinitsky.maxim@gmail.com.

Received March 18, 2022

Поступила 18.03.2022