



УДК 57.085.23:57.085.1

DOI 10.17802/2306-1278-2024-13-4S-97-106

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ОТВЕТ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ВОЗДЕЙСТВИЕ ДОКСОРУБИЦИНА: РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ *IN VITRO* И *IN VIVO*

А.В. Синицкая, М.В. Хуторная, О.Н. Хрячкова, А.О. Поддубняк, М.А. Асанов,  
А.А. Ключева, М.Ю. Синицкий

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», бульвар им. академика Л.С. Барбараша, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

### Основные положения

- Доксорубин – антибиотик антрациклинового ряда, используемый для лечения некоторых форм онкологических заболеваний, применение которого сопряжено с развитием ряда осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы.
- Проведенные *in vitro* и *in vivo* эксперименты с применением первичных эндотелиальных клеток коронарной и внутренней грудной артерий и нормолипидемических крыс линии Wistar показали, что воздействие доксорубина приводит к изменению профиля генной экспрессии эндотелиальных клеток, свидетельствующему о незначительном нарушении ключевых звеньев патогенеза эндотелиальной дисфункции.

ORIGINAL STUDIES

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Цель               | Оценка профиля экспрессии генов-маркеров эндотелиальной дисфункции в эндотелиальных клетках при воздействии доксорубина в экспериментах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Материалы и методы | Использованы коммерческие культуры первичных эндотелиальных клеток коронарной и внутренней грудной артерий, которые подвергались воздействию доксорубина в концентрации 2 мкг/мл в течение суток, а также нормолипидемические крысы линии Wistar, которым в хвостовую вену в течение четырех недель вводили доксорубин в концентрации 2 мкг/кг веса. Оценка эндотелиальной дисфункции проведена путем измерения экспрессии генов <i>VCAM1</i> , <i>ICAM1</i> , <i>SELE</i> , <i>SELP</i> , <i>IL6</i> , <i>CXCL8</i> , <i>CCL2</i> , <i>CXCL1</i> , <i>MIF</i> , <i>VWF</i> , <i>SERPINE1</i> , <i>PLAU</i> , <i>PLAT</i> , <i>KLF2</i> , <i>KLF4</i> , <i>NFE2L2</i> , <i>NOS3</i> , <i>SNAI1</i> , <i>SNAI2</i> , <i>TWIST1</i> , <i>ZEB1</i> , <i>CDH5</i> и <i>CDH2</i> в лизате эндотелиальных клеток, а также в смыве эндотелиального монослоя с нисходящей аорты крыс методом количественной полимеразной цепной реакции. |
| Результаты         | Добавление доксорубина в концентрации 2 мкг/мл приводило к увеличению экспрессии генов, <i>IL6</i> , <i>CXCL8</i> и <i>CCL2</i> как в клетках HCAEC, так и в клетках HITAEC, а также к снижению уровня генов <i>PECAM</i> и <i>MIF</i> и <i>NOS3</i> в культурах HCAEC. Уровень мРНК генов транскрипционного фактора <i>ZEB1</i> и VE-кадгерина ( <i>CDH5</i> ), а также <i>CXCL1</i> был снижен по сравнению с контролем в обеих клеточных линиях. Измерение экспрессии генов в эндотелиальном лизате аорты крыс линии Wistar из экспериментальной группы относительно контроля показало выраженное повышение уровня мРНК генов <i>Ccl2</i> и снижение экспрессии генов <i>Klf2</i> , <i>Plau</i> , <i>Nos3</i> , <i>Cdh2</i> , <i>Serpine</i> , <i>Vwf</i> .                                                                                                                                                                   |
| Заключение         | Проведенные <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> эксперименты с применением первичных эндотелиальных клеток коронарной и внутренней грудной артерий и нормолипидемических крыс линии Wistar показали, что воздействие доксорубина приводит к изменению профиля генной экспрессии эндотелиальных клеток, свидетельствующему о незначительном нарушении ключевых звеньев патогенеза эндотелиальной дисфункции.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Ключевые слова     | Эндотелиальные клетки • Экспрессия генов • Эндотелиальная дисфункция • мРНК • Доксорубин                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

Поступила в редакцию: 24.09.2024; поступила после доработки: 05.10.2024; принята к печати: 14.11.2024

Для корреспонденции: Анна Викторовна Синицкая, [annasepokina@mail.ru](mailto:annasepokina@mail.ru); адрес: бульвар им. академика Л.С. Барбараша, 6, Кемерово, Российская Федерация, 650002

Corresponding author: Anna Viktorovna Sinitskaya, [annasepokina@mail.ru](mailto:annasepokina@mail.ru); 6, academician Barbarash blvd., Kemerovo, Russian Federation, 650002

## MOLECULAR GENETIC RESPONSE OF ENDOTHELIAL CELLS TO DOXORUBICIN EXPOSURE: RESULTS OF *IN VITRO* AND *IN VIVO* STUDY

A.V. Sinitskaya, M.V. Khutornaya, O.N. Hryachkova, A.O. Poddubnyak, M.A. Asanov,  
A.A. Klueva, M.Yu. Sinitsky

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

### Highlights

- Doxorubicin is an anthracycline-type antibiotic used to treat certain forms of cancer, the use of which is associated with the development of a number of complications in the cardiovascular system.
- *In vitro* and *in vivo* experiments using primary endothelial cells of the coronary and internal thoracic arteries and normolipidemic Wistar rats have shown that exposure to doxorubicin leads to a change in the gene expression profile of endothelial cells, indicating a minor disruption of key links in the pathogenesis of endothelial dysfunction.

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Aim</b>        | To assess the expression profile of endothelial dysfunction marker genes in endothelial cells exposed to doxorubicin in <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> experiments.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Methods</b>    | The study included commercial cultures of primary human coronary and internal thoracic artery endothelial cells exposed to 2 µg/mL doxorubicin for 24 hours, and normolipidemic Wistar rats, which were injected with 2 µg/kg of body weight doxorubicin into the tail vein for four weeks. Endothelial dysfunction was assessed by measuring the expression of <i>VCAM1</i> , <i>ICAM1</i> , <i>SELE</i> , <i>SELP</i> , <i>IL6</i> , <i>CXCL8</i> , <i>CCL2</i> , <i>CXCL1</i> , <i>MIF</i> , <i>VWF</i> , <i>SERPINE1</i> , <i>PLAU</i> , <i>PLAT</i> , <i>KLF2</i> , <i>KLF4</i> , <i>NFE2L2</i> , <i>NOS3</i> , <i>SNAI1</i> , <i>SNAI2</i> , <i>TWIST1</i> , <i>ZEB1</i> , <i>CDH5</i> and <i>CDH2</i> genes in endothelial cell lysate and in endothelial monolayer washed from rat descending aorta using quantitative polymerase chain reaction. |
| <b>Results</b>    | 2 µg/mL doxorubicin exposure is associated with upregulation of <i>IL6</i> , <i>CXCL8</i> and <i>CCL2</i> genes in both HCAEC and HITAEC, and downregulation of <i>PECAM</i> , <i>MIF</i> and <i>NOS3</i> genes in HCAEC. The mRNA level of transcription factors <i>ZEB1</i> , VE-cadherin ( <i>CDH5</i> ) and <i>CXCL1</i> was lower compared to the control in both cell lines. The assessment of gene expression in the endothelial lysate of aorta explanted from Wistar rats showed increased expression of the <i>Ccl2</i> gene and the decreased expression of the <i>Klf2</i> , <i>Plau</i> , <i>Nos3</i> , <i>Cdh2</i> , <i>Serpine</i> and <i>Vwf</i> genes in the experimental group compared to the control.                                                                                                                                 |
| <b>Conclusion</b> | <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> experiments using primary coronary and internal mammary artery endothelial cells and normolipidemic Wistar rats showed that doxorubicin exposure leads to some changes in the gene expression profile of endothelial cells, indicating minor disruption of key links in the pathogenesis of endothelial dysfunction.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Keywords</b>   | Endothelial cells • Gene expression • Endothelial dysfunction • mRNA • Doxorubicin                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

Received: 24.09.2024; received in revised form: 05.10.2024; accepted: 14.11.2024

### Введение

Эндотелий сосудов – полупроницаемый барьер, регулирующий обмен жидкостями и питательными веществами между кровью и окружающими тканями, нормальное функционирование которого необходимо для поддержания гомеостаза. Наличие хронических заболеваний (сахарный диабет, ожирение, дислипидемия и др.) приводит к нарушению физиологических функций и изменению молекулярно-генетического ландшафта эндотелия, следствием чего является развитие эндотелиальной дисфункции [1]. Эндотелиальная

дисфункция может развиваться при нарушении баланса вазодилататоров и вазоконстрикторов, что служит пусковым фактором вазоспастической дисфункции. В недавних исследованиях продемонстрировано, что эндотелиальная дисфункция может сопровождаться эндотелиально-мезенхимальным переходом, возникающим в результате повышения экспрессии провоспалительных цитокинов и молекул клеточной адгезии [2]. Вместе с тем показано, что нарушение функций эндотелия может происходить под действием окислительно- и нитрозивного стресса при лечении онкологиче-

ческих заболеваний антрациклиновыми антибиотиками [3].

К антибиотикам антрациклинового ряда относятся блеомицин, дактиномицин, митомицин, а также доксорубин, являющийся на сегодняшний день одним из основных препаратов, используемых в химиотерапии [4]. Известно, что доксорубин вызывает избыточную продукцию активных форм кислорода, влияя на NO-сигналинг, что в конечном итоге приводит к нарушению эндотелий-зависимой вазодилатации [5, 6]. В культурах эндотелиальных клеток доксорубин вызывает митохондриальную дисфункцию, подавляя антиоксидантные ферменты и увеличивая биоактивность активных форм кислорода [7]. Эксперименты на моделях крупных животных показали, что введение доксорубина приводит к изменению в различных видах артерий, а также незначительному снижению плотности капилляров [8].

Несмотря на то что негативные эффекты доксорубина на эндотелий сосудов известны, лежащие в их основе молекулярные механизмы изучены недостаточно. Более того, особый интерес представляет поиск специфических маркеров, позволяющих на ранних стадиях антрациклиновой терапии обнаружить патологические изменения эндотелия. В качестве таких маркеров может быть использована панель генов, разработанная А.Г. Кутихиным и коллегами для скрининга эндотелиальной дисфункции и включающая в себя маркеры провоспалительной и протромботической активации эндотелия, нарушения эндотелиальной механотрансдукции, эндотелиально-мезенхимального перехода и синтеза монооксида азота [9].

**Цель настоящего исследования** – оценка профиля экспрессии генов-маркеров эндотелиальной дисфункции в эндотелиальных клетках при воздействии доксорубина в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

## Материалы и методы

Для проведения экспериментальной части работ на модели *in vitro* использованы коммерческие культуры клеток первичных эндотелиальных клеток коронарной (HCAEC, 300K-05a, Cell Applications, США) и внутренней грудной (HITAEC, 308K-05a, Cell Applications, США) артерий человека. Клетки размораживали и культивировали во флаконах T-75 в среде для роста клеток Human MesoEndo Growth Medium (212-500, Cell Applications, США). Пересев клеток проводили при достижении 80% конфлюэнтности. Далее в культуральные флаконы добавляли доксорубина гидрохлорид (Sigma Aldrich, США) в концентрации 2 мкг/мл и инкубировали исследуемые клеточные линии в течение 24 ч, в контрольные культуры добавляли деионизированную воду в объеме, равном объему доксо-

рубина. Все культуральные работы проводили в стерильных условиях при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> и высокой влажности (Sanyo, Япония). По истечении инкубации клетки отмывали холодным фосфатно-солевым буфером (10010023, Thermo Fisher Scientific, США) с дальнейшим лизированием тризолом (15596018, Thermo Fisher Scientific, США) для выделения суммарной РНК.

Для экспериментов на модели *in vivo* использовали самцов нормолипидемических крыс линии Wistar (n = 20) массой тела 250 г в возрасте 10 нед., которых содержали в виварии отдела экспериментальной медицины ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (Кемерово, Россия). Распределение животных по группам и клеткам проводили без рандомизации и критериев включения и исключения. Условия содержания и манипуляции над животными соответствовали положениям Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Всем животным проводили инъекции доксорубина гидрохлорида (2 мг/кг веса, кумулятивная доза доксорубина составила 2,4 мг на одно животное) либо 0,9% раствора NaCl (контрольная группа) в хвостовую вену на протяжении четырех недель, без хирургического вмешательства. Через неделю после последней инъекции выводили животных из эксперимента путем внутрибрюшинного введения пентобарбитала натрия (100 мг/кг массы тела) с дальнейшей эксплантацией нисходящей части аорты. Полученный участок аорты промывали от остатков крови 0,9% раствором NaCl, затем проводили смыв внутреннего эндотелиального монослоя лизирующим раствором TRIzol (15596018, Thermo Fisher Scientific, США) для последующего выделения РНК.

РНК выделяли с помощью стандартного протокола гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции. Качество и количество выделенной РНК проверяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (ND 2000C, Thermo Fisher Scientific, США) и спектрофлуориметре Qubit 4 (Q33238, Thermo Fisher Scientific, США). Реакцию обратной транскрипции проводили на основе выделенной РНК с использованием набора High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814, Thermo Fisher Scientific, США). Количественную ПЦР выполняли с использованием праймеров, синтезированных компанией ЗАО «Евроген» (Россия), и мастер-микса «БиоМастер» UDG HS-qPCR SYBR Blue (2×) (MHC031-2040, ООО «Биолабмикс», Россия) на приборе CFX96 Touch (1855195, BioRad, США). Исследуемые гены и их последовательность представлены в табл. 1. Нормирование результатов ПЦР проводили на референсные гены: для лизата эндо-

**Table 1.** Последовательности праймеров исследуемых генов  
**Table 1.** Primer sequences of the studied genes

| Ген / Gene                                                                                                                                           | Прямой праймер / Forward primer | Обратный праймер / Reverse primer |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Последовательность праймеров для измерения экспрессии генов человека ( <i>Homo sapiens</i> ) / Human ( <i>Homo sapiens</i> ) genes                   |                                 |                                   |
| <i>ACTB</i>                                                                                                                                          | 5'-CATCGAGCACGGCATCGTCA-3'      | 5'-TAGCACAGCCTGGACAGCAAC-3'       |
| <i>GAPDH</i>                                                                                                                                         | 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'       | 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'         |
| <i>B2M</i>                                                                                                                                           | 5'-TCCATCCGACATTGAAGTTG-3'      | 5'-CGGCAGGCATACTCATCTT-3'         |
| <i>VCAM1</i>                                                                                                                                         | 5'-CGTCTTGGTCAGCCCTTCCT-3'      | 5'-ACATTCATATACTCCCGCATCCTTC-3'   |
| <i>ICAM1</i>                                                                                                                                         | 5'-TTGGGCATAGAGACCCCGTT-3'      | 5'-GCACATTGCTCAGTTCATACACC-3'     |
| <i>PECAM1</i>                                                                                                                                        | 5'-TGCGCATGCCTGTAGTA-3'         | 5'-TCCGTTTCCTGGGTTCAA-3'          |
| <i>SELE</i>                                                                                                                                          | 5'-GCACAGCCTTGTCCAACC-3'        | 5'-ACCTCACCAAACCCTTCG-3'          |
| <i>SELP</i>                                                                                                                                          | 5'-ATGGGTGGGAACCAAAAAGG-3'      | 5'-GGCTGACGACTCTTGATGTAT-3'       |
| <i>IL6</i>                                                                                                                                           | 5'-GGCACTGGCAGAAAACAACC-3'      | 5'-GCAAGTCTCCTCATTGAATCC-3'       |
| <i>CXCL8</i>                                                                                                                                         | 5'-CAGAGACAGCAGAGCACAC-3'       | 5'-AGTTCTTTAGACTCCTTGGC-3'        |
| <i>CCL2</i>                                                                                                                                          | 5'-TTCTGTGCCTGCTGCTCATAG-3'     | 5'-AGGTGACTGGGGCATTGATTG-3'       |
| <i>CXCL1</i>                                                                                                                                         | 5'-GCTTGCCTCAATCCTGCATCC-3'     | 5'-ACAATCCAGGTGGCCTCTGC-3'        |
| <i>MIF</i>                                                                                                                                           | 5'-GGTGTCGAGAAGTCAGGCA-3'       | 5'-GGGGCACGTTGGTGTTTACG-3'        |
| <i>VWF</i>                                                                                                                                           | 5'-CCTTGACCTCGGACCCTTATG-3'     | 5'-GATGCCCCTTCACACCACT-3'         |
| <i>SERPINE1</i>                                                                                                                                      | 5'-CGCCGCCTCTTCCACAAATC-3'      | 5'-AGGGCAGTTCAGGATGTCTG-3'        |
| <i>PLAU</i>                                                                                                                                          | 5'-CCTGGGTCGCTCAAGGCTTA-3'      | 5'-CACACCTGCCCTCCTTGGA-3'         |
| <i>PLAT</i>                                                                                                                                          | 5'-TGGAGCAGTCTTCGTTTCGC-3'      | 5'-CCATGACTGATGTTGCTGGTA-3'       |
| <i>NOS3</i>                                                                                                                                          | 5'-GTGATGGCGAAGCGAGTGAAG-3'     | 5'-CCGAGCCCGAACACACAGAAC-3'       |
| <i>SNAI1</i>                                                                                                                                         | 5'-CAGACCCACTCAGATGTCAAGAA-3'   | 5'-GGGCAGGTATGGAGAGGAAGA-3'       |
| <i>SNAI2</i>                                                                                                                                         | 5'-ACTCCGAAGCCAAATGACAA-3'      | 5'-CTCTCTCTGTGGGTGTGTGT-3'        |
| <i>TWIST1</i>                                                                                                                                        | 5'-GTCCGCAGTCTTACGAGGAG-3'      | 5'-GCTTGAGGGTCTGAATCTTGCT-3'      |
| <i>ZEB1</i>                                                                                                                                          | 5'-GATGATGAATGCGAGTCAGATGC-3'   | 5'-ACAGCAGTGTCTTGTGTTGT-3'        |
| <i>CDH5</i>                                                                                                                                          | 5'-AAGCGTGAGTCGAAGAATG-3'       | 5'-TCTCCAGGTTTCGCCAGTG-3'         |
| <i>CDH2</i>                                                                                                                                          | 5'-GCTTCTGGTGAAATCGCATTA-3'     | 5'-AGTCTCTCTTCTGCCTTTGTAG-3'      |
| Последовательность праймеров для измерения экспрессии генов лабораторной крысы ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / Rat ( <i>Rattus norvegicus</i> ) genes |                                 |                                   |
| <i>Actb</i>                                                                                                                                          | 5'-ACAACCTTCTTGAGCTCCTC-3'      | 5'-CCATACCCACCATCACACCCT-3'       |
| <i>B2m</i>                                                                                                                                           | 5'-GGTGACCGTGATCTTCTGGTG-3'     | 5'-TGAGGAAGTTGGGCTTCCATT-3'       |
| <i>Tbp</i>                                                                                                                                           | 5'-TGCCAAGTGTGAGCCTCTCC-3'      | 5'-TGGGTATCGCACGCACCAT-3'         |
| <i>Vcam1</i>                                                                                                                                         | 5'-GGAAATGCCACCCTCACCTTA-3'     | 5'-TCCAGGGGAGATGTCAACACAGT-3'     |
| <i>Icam1</i>                                                                                                                                         | 5'-CGACATTGGGGAAGACAGCAG-3'     | 5'-TCCACTCGCTCTGGGAACG-3'         |
| <i>Sele</i>                                                                                                                                          | 5'-TGTGGTCCAAGAGGGGAGTG-3'      | 5'-GCCCCACTGCAACTCATGTTCA-3'      |
| <i>Selp</i>                                                                                                                                          | 5'-GCCCTCCAATGTGTGAAGCC-3'      | 5'-CAGGTGGAGCCGACACTGAA-3'        |
| <i>Il6</i>                                                                                                                                           | 5'-AGCCCACCAGGAACGAAAGTC-3'     | 5'-AGGGAAGGCAGTGGCTGTCA-3'        |
| <i>Ccl2</i>                                                                                                                                          | 5'-ACGCTTCTGGGCCTGTTGTT-3'      | 5'-TCCAGCCGACTCATTGGGAT-3'        |
| <i>Cxcl1</i>                                                                                                                                         | 5'-CACTGCACCCAAACCGAAGT-3'      | 5'-TGGGGACACCCTTTAGCATCT-3'       |
| <i>Mif</i>                                                                                                                                           | 5'-GTCACGTAGCTCAGGTCCCA-3'      | 5'-CTCGGAGAGAAACCCCTCTG-3'        |
| <i>Vwf</i>                                                                                                                                           | 5'-AACCACGCTTGACCAGGTT-3'       | 5'-CTGTCAGCGCAGGAGCAAAC-3'        |
| <i>Serpine1</i>                                                                                                                                      | 5'-CTCAACCCAGGCCGACTTCA-3'      | 5'-CACTGTGCCGCTCTCGTTCA-3'        |
| <i>Plau</i>                                                                                                                                          | 5'-GTGGTGGGAGCCTCATCAGT-3'      | 5'-CGCTTCGACTGACCCAGGTA-3'        |
| <i>Plat</i>                                                                                                                                          | 5'-GGGACCAACTGAGGACTGCT-3'      | 5'-GCCCTCCACGCTGTGTAAGT-3'        |
| <i>Klf2</i>                                                                                                                                          | 5'-CACCAACTGCGGCAAGACCT-3'      | 5'-GTAGTGGCGGGTAAGCTCGTCA-3'      |
| <i>Klf4</i>                                                                                                                                          | 5'-GACTATGCAGGCTGTGGCAAA-3'     | 5'-CGGTAGTGCCTGGTCAGTTCA-3'       |
| <i>Nfe2l2</i>                                                                                                                                        | 5'-CAGTGGATCTGTCAGCTACTCC-3'    | 5'-CTCTCAACGTGGCTGGGAAT-3'        |
| <i>Nos3</i>                                                                                                                                          | 5'-GGTGACCAGCACATTTGGCA-3'      | 5'-GCCGCCAAGAGGATACCAGT-3'        |
| <i>Snai1</i>                                                                                                                                         | : 5'-TGGGCCAACTTCCCAAGCA-3'     | 5'-GTGGGAGCAGGAGAAAGGCT-3'        |
| <i>Snai2</i>                                                                                                                                         | 5'-GCCCAACTACAGCGAACTGGA-3'     | 5'-TGGAATGGAAGTCTGATGTCC-3'       |
| <i>Twist1</i>                                                                                                                                        | 5'-ATGTCCGCGTCCCACTAGCA-3'      | 5'-CCCCACGCCCTGATTCTTGT-3'        |
| <i>Zeb1</i>                                                                                                                                          | 5'-CCAGTGAAGGTGATCCAGCCA-3'     | 5'-CTTTTTGGGTGGCGTGCAGT-3'        |
| <i>Cdh5</i>                                                                                                                                          | 5'-ACAAGGACGTGGTGCCAGTA-3'      | 5'-GGGCATCCCATTGTCGGAGA-3'        |
| <i>Cdh2</i>                                                                                                                                          | 5'-ACCCAGGAAAAGTGGCAGGT-3'      | 5'-GCTGTGCTTGCCAGTTGTC-3'         |

телиальных клеток человека *ACTB*, *GAPDH* и *B2M*, для эндотелиального лизата крыс *Actb*, *Tbp* и *B2m*.

Статистический анализ данных осуществляли в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Экспрессию генов рассчитывали методом  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  и выражали в виде кратности ее изменения в экспериментальной группе относительно контроля. Данные представлены в виде среднего арифметического (m) и стандартного отклонения (SD). Значения считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Показано, что добавление доксорубина в концентрации 2 мкг/мл приводит к выраженному увеличению экспрессии генов, кодирующих провоспалительные цитокины (*IL6*, *CXCL8*) и хемокины (*CCL2*), как в клетках HCAEC, так и HITAEC. Вместе с тем отмечено значимое снижение уровня мРНК генов *PECAM* и *MIF*, а также *NOS3* в культурах HCAEC. При этом в обеих изученных клеточных линиях гены-маркеры эндотелиально-мезенхимального перехода *SNAI1*, *SNAI2* и *TWIST1* не экспрессировались, а уровень мРНК генов транскрипционного фактора *ZEB1* и VE-кадгерина (*CDH5*), а также *CXCL1* был снижен по сравнению с контролем. Помимо этого, наблюдались различия в профиле генной экспрессии молекул протромботической активации эндотелия между двумя клеточными линиями. Так, в клетках HITAEC определено снижение экспрессии генов *vWF* (фактор фон Виллебранда) и *SERPINE1* (ингибитор активатора плазминогена), увеличение экспрессии гена *PLAT*, а в клетках HCAEC наблюдалась гипоэкспрессия генов *PLAU* и *PLAT* (табл. 2).

Измерение экспрессии генов в эндотелиальном лизате аорты крыс линии Wistar из экспериментальной группы относительно контроля показало выраженное повышение уровня мРНК генов моноцитарного хемоаттрактантного белка (*Ccl2*) и снижение экспрессии генов *Klf2*, *Plau*, *Nos3*, *Cdh2*, *Serpine*, *Vwf*. Экспрессия остальных генов существенно не различалась (табл. 3).

## Обсуждение

В проведенном исследовании продемонстрированы различия в профиле генной экспрессии эндотелиальных клеток при воздействии доксорубина в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Доксорубин – антибиотик антрациклинового ряда, широко применяемый для лечения некоторых форм онкологических заболеваний. Наряду с положительной динамикой при лечении пациентов данным антибиотиком наблюдается развитие осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы (дисфункция левого желудочка, сердечная недостаточность, кардиомиопатии), которые могут проявляться как

на момент лечения, так и через несколько лет после его завершения [10]. В качестве основных механизмов развития кардиотоксичности, вызванной доксорубином, на сегодняшний день принято рассматривать окислительный стресс, митохондриальную дисфункцию, стресс эндоплазматического ретикулума, нарушение регуляции ионов кальция и железа, а также аэрофагию [11–13].

Наряду с изучением кардиотоксических эффектов при терапии доксорубином в последние пять лет особое внимание уделяется сосудистой токсичности [14]. Антиагрегантная, антикоагулянтная и противовоспалительная функции эндотелия обеспечиваются только в случае его нормального функционирования. Нарушение целостности эндотелия любым из триггеров физической или химической природы может являться пусковым фактором развития эндотелиальной дисфункции, а также серьезных заболеваний сердечно-сосудистого континуума (ишемическая болезнь сердца, ишемический инсульт, венозная тромбоэмболия) [15]. Ключевыми признаками эндотелиальной дисфункции служат повышенная адгезия лейкоцитов к эндотелиальному монослою (провоспалительная активация эндотелия), нарушение биосинтеза монооксида азота, нарушение эндотелиальной механотрансдукции, эндотелиально-мезенхимальный переход и протромботическая активация эндотелия [16–18].

Провоспалительная активация эндотелия включает два важных этапа. Во-первых, это связывание рецепторов лейкоцитов соответствующими рецепторами на поверхности эндотелиальных клеток, во-вторых, увеличение секреции провоспалительных цитокинов эндотелиальными клетками [19]. Полученные нами результаты в экспериментах *in vitro* продемонстрировали повышенный уровень экспрессии генов, кодирующих провоспалительные цитокины (*IL6*, *CXCL8* и *CCL2*) в ответ на экспозицию клеток доксорубином, в то время как экспрессия генов, кодирующих молекулы клеточной адгезии (*VCAM*, *ICAM* и *SELE*), значимо не различалась в экспериментальных культурах относительно контроля. Вместе с тем в срезах эндотелиального монослоя нисходящей аорты (эксперимент *in vivo*) обнаружена гиперэкспрессия гена *Ccl2*, для остальных генов значимых изменений не определено. Таким образом, можно сделать вывод о том, что экспозиция первичных эндотелиальных клеток как коронарной, так и внутренней грудной артерии доксорубином в экспериментах *in vitro* приводит к их выраженной провоспалительной активации, однако в эндотелии аорты лабораторных животных данного феномена не зарегистрировано.

На сегодняшний день опубликован ряд работ, посвященных описанию развития эндотелиально-мезенхимального перехода на фоне лечения доксорубином. Эндотелиально-мезенхимальный

Таблица 2. Изменение экспрессии генов в эндотелиальном лизате клеток, экспонированных доксорубином  
Table 2. Gene expression profile of endothelial cells exposed to doxorubicin

| Ген / Gene                                                                     |                  | Первичные эндотелиальные клетки коронарной артерии / Human coronary artery endothelial cells |                                            |                                              | Первичные эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии / Human internal thoracic artery endothelial cells |                                            |                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------|
|                                                                                |                  | Контроль / Control                                                                           | Доксорубин, 2 мкг/мл / 2 µg/mL doxorubicin | Кратность изменения экспрессии / Fold-change | Контроль / Control                                                                                            | Доксорубин, 2 мкг/мл / 2 µg/mL doxorubicin | Кратность изменения экспрессии / Fold-change |
| Провоспалительная активация эндотелия / Proinflammatory endothelial activation |                  |                                                                                              |                                            |                                              |                                                                                                               |                                            |                                              |
| VCAM                                                                           | ΔCt, m ± SD      | 0,0008133 ± 0,0001306                                                                        | 0,0009718 ± 0,0005155                      | 1,19                                         | 0,004498                                                                                                      | 0,01730 ± 0,01040                          | 2,09                                         |
|                                                                                | p                | 0,8073                                                                                       |                                            |                                              | 0,3504                                                                                                        |                                            |                                              |
| ICAM                                                                           | ΔCt, m ± SD      | 0,09610 ± 0,02070                                                                            | 0,09119 ± 0,02779                          | 0,94                                         | 0,08484 ± 0,007434                                                                                            | 0,02330 ± 0,005957                         | 0,27                                         |
|                                                                                | p                | 0,4499                                                                                       |                                            |                                              | 0,0238                                                                                                        |                                            |                                              |
| PECAM                                                                          | ΔCt, m ± SD      | 1,510 ± 0,1178                                                                               | 0,2989 ± 0,01266                           | 0,19                                         | 0,6243 ± 0,009222                                                                                             | 0,4510 ± 0,04143                           | 0,72                                         |
|                                                                                | p                | 0,0006                                                                                       |                                            |                                              | 0,0260                                                                                                        |                                            |                                              |
| SELE                                                                           | ΔCt, m ± SD      | 0,003465 ± 0,0009092                                                                         | 0,002304 ± 0,0007048                       | 0,66                                         | NA                                                                                                            | NA                                         | NA                                           |
|                                                                                | p                | 0,0672                                                                                       |                                            |                                              | NA                                                                                                            |                                            |                                              |
| SELP                                                                           | ΔCt, m ± SD      | 0,003835 ± 0,0009092                                                                         | 0,001304 ± 0,0007048                       | 0,34                                         | 0,009203 ± 0,000                                                                                              | 0,01862 ± 0,000                            | 2,02                                         |
|                                                                                | p                | 0,0582                                                                                       |                                            |                                              | 0,05                                                                                                          |                                            |                                              |
| IL6                                                                            | ΔCt, m ± SD      | 0,003342992 ± 0,0001656                                                                      | 0,007628698 ± 0,0005912                    | 2,28                                         | 0,00365436 ± 0,000                                                                                            | 0,011307283 ± 0,004463                     | 3,09                                         |
|                                                                                | p                | 0,0023                                                                                       |                                            |                                              | 0,2914                                                                                                        |                                            |                                              |
| CXCL8                                                                          | ΔCt, ΔCt, m ± SD | 0,06555 ± 0,004207                                                                           | 0,4279 ± 0,05450                           | 6,52                                         | 0,013554218 ± 0,002012                                                                                        | 0,043319441 ± 0,00198                      | 3,19                                         |
|                                                                                | p                | 0,0002                                                                                       |                                            |                                              | 0,7750                                                                                                        |                                            |                                              |
| CCL2                                                                           | ΔCt, ΔCt, m ± SD | 0,47132 ± 0,005642                                                                           | 1,989 ± 0,2416                             | 4,22                                         | 0,1208 ± 0,09103                                                                                              | 0,4832 ± 0,01731                           | 4,00                                         |
|                                                                                | p                | 0,0013                                                                                       |                                            |                                              | 0,0736                                                                                                        |                                            |                                              |
| CXCL1                                                                          | ΔCt, ΔCt, m ± SD | 0,7710 ± 0,03545                                                                             | 0,3785 ± 0,06639                           | 0,49                                         | 0,2071 ± 0,03143                                                                                              | 0,03202 ± 0,01223                          | 0,15                                         |
|                                                                                | p                | 0,0308                                                                                       |                                            |                                              | 0,0109                                                                                                        |                                            |                                              |
| MIF                                                                            | ΔCt, m ± SD      | 1,698 ± 0,3241                                                                               | 0,7373 ± 0,08511                           | 0,43                                         | 0,4966 ± 0,05062                                                                                              | 0,8950 ± 0,1431                            | 1,80                                         |
|                                                                                | p                | 0,0039                                                                                       |                                            |                                              | 0,031                                                                                                         |                                            |                                              |
| Протромбическая активация эндотелия / Protrombic endothelial activation        |                  |                                                                                              |                                            |                                              |                                                                                                               |                                            |                                              |
| vWF                                                                            | ΔCt, m ± SD      | 2,942 ± 1,384                                                                                | 1,521 ± 0,2232                             | 0,51                                         | 1,501 ± 0,1620                                                                                                | 0,2396 ± 0,1404                            | 0,15                                         |
|                                                                                | p                | 0,2957                                                                                       |                                            |                                              | 0,0370                                                                                                        |                                            |                                              |
| SERPINE1                                                                       | ΔCt, m ± SD      | 13,90 ± 0,7235                                                                               | 20,34 ± 1,486                              | 1,46                                         | 6,635 ± 1,997                                                                                                 | 3,007 ± 0,5964                             | 0,45                                         |
|                                                                                | p                | 0,0334                                                                                       |                                            |                                              | 0,0313                                                                                                        |                                            |                                              |
| PLAU                                                                           | ΔCt, m ± SD      | 0,2042 ± 0,01476                                                                             | 0,06863 ± 0,002833                         | 0,33                                         | 0,3075 ± 0,05591                                                                                              | 0,08710 ± 0,02689                          | 0,28                                         |
|                                                                                | p                | 0,0036                                                                                       |                                            |                                              | 0,1148                                                                                                        |                                            |                                              |
| PLAT                                                                           | ΔCt, m ± SD      | 0,4854 ± 0,03809                                                                             | 0,1927 ± 0,009172                          | 0,39                                         | 0,07897 ± 0,02357                                                                                             | 0,3846 ± 0,4903                            | 4,87                                         |
|                                                                                | p                | 0,0028                                                                                       |                                            |                                              | 0,0368                                                                                                        |                                            |                                              |
| Синтез монооксида азота (NO) / Nitric oxide synthesis                          |                  |                                                                                              |                                            |                                              |                                                                                                               |                                            |                                              |
| NOS3                                                                           | ΔCt, m ± SD      | 0,1015 ± 0,01134                                                                             | 0,03708 ± 0,004934                         | 0,36                                         | 0,02296 ± 0,02006                                                                                             | 0,02694 ± 0,000                            | 1,17                                         |
|                                                                                | p                | 0,0002                                                                                       |                                            |                                              | 0,5098                                                                                                        |                                            |                                              |
| Эндотелиально-мезенхимальный переход / Endothelial-to-mesenchymal transition   |                  |                                                                                              |                                            |                                              |                                                                                                               |                                            |                                              |
| SNAIL                                                                          | ΔCt, m ± SD      | NA                                                                                           | NA                                         | NA                                           | NA                                                                                                            | NA                                         | NA                                           |
| SNAIL2                                                                         | ΔCt, m ± SD      | NA                                                                                           | NA                                         | NA                                           | NA                                                                                                            | NA                                         | NA                                           |
| TWIST1                                                                         | ΔCt, m ± SD      | NA                                                                                           | NA                                         | NA                                           | NA                                                                                                            | NA                                         | NA                                           |
| ZEB1                                                                           | ΔCt, m ± SD      | 0,2031 ± 0,04681                                                                             | 0,05826 ± 0,007088                         | 0,28                                         | 0,03535 ± 0,009214                                                                                            | 0,008620 ± 0,000                           | 0,24                                         |
|                                                                                | p                | 0,0056                                                                                       |                                            |                                              | 0,0140                                                                                                        |                                            |                                              |
| CDH5                                                                           | ΔCt, m ± SD      | 6,743 ± 1,042                                                                                | 2,716 ± 0,2713                             | 0,40                                         | 1,4285 ± 0,3655                                                                                               | 0,1190 ± 0,02959                           | 0,17                                         |
|                                                                                | p                | 0,0013                                                                                       |                                            |                                              | 0,0043                                                                                                        |                                            |                                              |
| CDH2                                                                           | ΔCt, m ± SD      | 0,007708 ± 0,0003960                                                                         | 0,006749 ± 0,002968                        | 0,87                                         | 0,04723 ± 0,003205                                                                                            | 0,01599 ± 0,006327                         | 0,33                                         |
|                                                                                | p                | 0,5499                                                                                       |                                            |                                              | 0,1641                                                                                                        |                                            |                                              |

**Таблица 3.** Изменение уровня мРНК в эндотелиальном лизате аорты крыс линии Wistar  
**Table 3.** Gene expression profile of endothelial monolayer of aorta explanted from Wistar rats exposed to doxorubicin

| Ген / Gene                                                                                 |             | Эндотелиальный лизат аорты крыс линии Wistar / Endothelial monolayer of aorta explanted from Wistar rats |                          |                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------------|
|                                                                                            |             | Контроль / Control                                                                                       | Доксорубин / Doxorubicin | Кратность изменения экспрессии / Fold-change |
| Провоспалительная активация эндотелия / Proinflammatory endothelial activation             |             |                                                                                                          |                          |                                              |
| Vcam1                                                                                      | ΔCt, m ± SD | 0,1322 ± 0,1749                                                                                          | 0,08733 ± 0,02345        | 0,66                                         |
|                                                                                            | p           | 0,4155                                                                                                   |                          |                                              |
| Icam1                                                                                      | ΔCt, m ± SD | 0,03337 ± 0,03212                                                                                        | 0,02390 ± 0,007610       | 0,71                                         |
|                                                                                            | p           | 0,7968                                                                                                   |                          |                                              |
| Pecam                                                                                      | ΔCt, m ± SD | 0,4146 ± 0,4840                                                                                          | 0,2576 ± 0,07031         | 0,62                                         |
|                                                                                            | p           | 0,5800                                                                                                   |                          |                                              |
| Sele                                                                                       | ΔCt, m ± SD | 0,01200 ± 0,01050                                                                                        | 0,006632 ± 0,003748      | 0,55                                         |
|                                                                                            | p           | 0,1484                                                                                                   |                          |                                              |
| Selp                                                                                       | ΔCt, m ± SD | 0,01333 ± 0,02126                                                                                        | 0,02614 ± 0,1014         | 1,96                                         |
|                                                                                            | p           | 0,2372                                                                                                   |                          |                                              |
| Il6                                                                                        | ΔCt, m ± SD | 0,04419 ± 0,03445                                                                                        | 0,04503 ± 0,02849        | 1,01                                         |
|                                                                                            | p           | 0,4895                                                                                                   |                          |                                              |
| Ccl2                                                                                       | ΔCt, m ± SD | 0,0007996 ± 0,0005530                                                                                    | 0,001613 ± 0,001143      | 2,01                                         |
|                                                                                            | p           | 0,0114                                                                                                   |                          |                                              |
| Cxcl1                                                                                      | ΔCt, m ± SD | 0,0005962 ± 0,0006348                                                                                    | 0,0006749 ± 0,0009328    | 1,13                                         |
|                                                                                            | p           | 0,4225                                                                                                   |                          |                                              |
| Mif                                                                                        | ΔCt, m ± SD | 0,01956 ± 0,01641                                                                                        | 0,01972 ± 0,01896        | 1,01                                         |
|                                                                                            | p           | 0,4773                                                                                                   |                          |                                              |
| Протромбическая активация эндотелия / Protrombic endothelial activation                    |             |                                                                                                          |                          |                                              |
| Vwf                                                                                        | ΔCt, m ± SD | 0,8831 ± 1,510                                                                                           | 0,8660 ± 2,853           | 0,98                                         |
|                                                                                            | p           | 0,0228                                                                                                   |                          |                                              |
| Serpine1                                                                                   | ΔCt, m ± SD | 0,007969 ± 0,007901                                                                                      | 0,004860 ± 0,003716      | 0,60                                         |
|                                                                                            | p           | 0,0326                                                                                                   |                          |                                              |
| Plau                                                                                       | ΔCt, m ± SD | 0,02715 ± 0,04411                                                                                        | 0,008736 ± 0,01106       | 0,32                                         |
|                                                                                            | p           | 0,047                                                                                                    |                          |                                              |
| Plat                                                                                       | ΔCt, m ± SD | 0,02257 ± 0,02653                                                                                        | 0,01987 ± 0,02746        | 0,88                                         |
|                                                                                            | p           | 0,4121                                                                                                   |                          |                                              |
| Нарушение эндотелиальной механотрансдукции / Impairment of endothelial mechanotransduction |             |                                                                                                          |                          |                                              |
| Klf2                                                                                       | ΔCt, m ± SD | 0,3107 ± 0,3455                                                                                          | 0,1363 ± 0,1145          | 0,43                                         |
|                                                                                            | p           | 0,0005                                                                                                   |                          |                                              |
| Klf4                                                                                       | ΔCt, m ± SD | 0,1613 ± 0,1646                                                                                          | 0,1397 ± 0,05619         | 0,86                                         |
|                                                                                            | p           | 0,7004                                                                                                   |                          |                                              |
| Nfe2l2                                                                                     | ΔCt, m ± SD | 1,7155 ± 1,350                                                                                           | 4,306 ± 8,196            | 2,51                                         |
|                                                                                            | p           | 0,1109                                                                                                   |                          |                                              |
| Синтез монооксида азота (NO) / Nitric oxide synthesis                                      |             |                                                                                                          |                          |                                              |
| Nos3                                                                                       | ΔCt, m ± SD | 0,2008 ± 0,2953                                                                                          | 0,02683 ± 0,02691        | 0,13                                         |
|                                                                                            | p           | 0,0001                                                                                                   |                          |                                              |
| Эндотелиально-мезенхимальный переход / Endothelial-to-mesenchymal transition               |             |                                                                                                          |                          |                                              |
| Snai1                                                                                      | ΔCt, m ± SD | 4,183 ± 7,145                                                                                            | 3,674 ± 6,806            | 0,87                                         |
|                                                                                            | p           | 0,1315                                                                                                   |                          |                                              |
| Snai2                                                                                      | ΔCt, m ± SD | 0,2756 ± 0,5744                                                                                          | 0,4084 ± 0,7780          | 1,48                                         |
|                                                                                            | p           | 0,4676                                                                                                   |                          |                                              |
| Twist1                                                                                     | ΔCt, m ± SD | 0,1084 ± 0,4460                                                                                          | 0,06265 ± 0,2106         | 0,57                                         |
|                                                                                            | p           | 0,7809                                                                                                   |                          |                                              |
| Zeb1                                                                                       | ΔCt, m ± SD | 7,247 ± 11,98                                                                                            | 7,138 ± 15,28            | 0,98                                         |
|                                                                                            | p           | 0,4133                                                                                                   |                          |                                              |
| Cdh5                                                                                       | ΔCt, m ± SD | 0,01428 ± 0,01041                                                                                        | 0,01543 ± 0,007911       | 1,80                                         |
|                                                                                            | p           | 0,4005                                                                                                   |                          |                                              |
| Cdh2                                                                                       | ΔCt, m ± SD | 0,05060 ± 0,06380                                                                                        | 0,06882 ± 0,03538        | 1,36                                         |
|                                                                                            | p           | 0,0110                                                                                                   |                          |                                              |

переход подразумевает потерю эндотелиальными клетками своих свойств и приобретение ими характеристики интерстициальных клеток, таких как фибробласты и гладкомышечные клетки [4]. На молекулярном уровне эндотелиально-мезенхимальный переход связан со снижением экспрессии классических эндотелиальных маркеров, таких как PECAM, VE-кадгерин, KDR, и гиперэкспрессией N-кадгерина, виментина, кальпони-на и др. [9]. Кроме того, регуляция эндотелиально-мезенхимального перехода осуществляется транскрипционными факторами Snail, Slug, Twist1, Gata4 и Zeb1 [20]. Стоит отметить, что в нашем исследовании гены *SNAIL*, *SNAI2* и *TWIST1*, кодирующие соответствующие белки, не экспрессировались в культурах первичных эндотелиальных клеток, в то время как в эндотелиальном лизате нисходящей аорты крыс линии Wistar отмечена тенденция к снижению уровней мРНК генов, ответственных за эндотелиально-мезенхимальный переход. Отсутствие экспрессии ключевых транскрипционных факторов может быть связано с тем, что данный процесс характерен для более позднего этапа эндотелиальной дисфункции и крайне сложно его детектировать на ранних этапах [19].

Эндотелиальная дисфункция также характеризуется снижением способности синтезировать монооксид азота (NO) эндотелиальными клетками. В представленном нами исследовании оценена экспрессия гена эндотелиальной NO-синтазы (*NOS3*), в результате чего показано, что добавление доксорубина в концентрации 2 мкг/мл в культуры НСАЕС приводило к снижению уровня мРНК гена *NOS3*, в то время как в клетках НТАЕС экспрессия данного гена не менялась. У нормолипидемических крыс линии Wistar также выявлена гипоекспрессия гена *Nos3* при введении доксорубина на протяжении четырех недель в концентрации 2 мг/кг веса. Таким

ОРИГИНАЛЬНЫЕ  
ИССЛЕДОВАНИЯ

образом, доксорубин способен вызвать нарушение функционирования NO-синтазы в различных экспериментальных моделях.

Нарушение эндотелиальной механотрансдукции – еще один немаловажный аспект развития эндотелиальной дисфункции, обуславливающий восприимчивость сосудов с турбулентным или ламинарным током крови к атеросклерозу. Основными транскрипционными факторами, обеспечивающие передачу сигналов от механосенсоров в клетке, являются *KLF2*, *KLF4* и *NRF2* [21], кодируемые генами *KLF2*, *KLF4* и *NFE2L2*. Исследование *in vivo* на модели крыс линии Wistar с регулярным введением доксорубина в хвостовую вену продемонстрировало снижение уровня экспрессии гена *Klf2* в эндотелии нисходящей аорты, что может свидетельствовать о незначительном нарушении механотрансдукции при введении доксорубина в кровотоки.

Протромботическая активация эндотелия – относительно новый критерий эндотелиальной дисфункции, изучение которого стало наиболее активным в период пандемии COVID-19. Характеризуется повышенной секрецией фактора фон Виллебранда (vWF) и ингибитора активации плазминогена (PAI-1) с одновременным снижением активаторов плазминогена uPA и tPA. В нашем эксперименте как *in vitro*, так и *in vivo* выявлена гипоекспрессия генов *SERPINE1/Serpine1*, *VWF/Vwf*, *PLAU/Plau*.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии изменений в профиле генной экспрессии при культивировании с доксорубином в концентрации 2 мкг/мл либо при его регулярном введении в хвостовую вену лабораторным животным. Однако, несмотря на выявленные различия, ответ на вопрос, способен ли доксорубин вызывать развитие эндотелиальной

дисфункции, остается открытым и требует дальнейшего изучения.

## Заключение

Проведенные *in vitro* и *in vivo* эксперименты с использованием первичных эндотелиальных клеток коронарной и внутренней грудной артерий и нормолипидемических крыс линии Wistar показали, что воздействие доксорубина приводит к изменению профиля генной экспрессии эндотелиальных клеток, свидетельствующему о незначительном нарушении ключевых звеньев патогенеза эндотелиальной дисфункции.

## Конфликт интересов

А.В. Синицкая заявляет об отсутствии конфликта интересов. М.В. Хуторная заявляет об отсутствии конфликта интересов. О.Н. Хрячкова заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.О. Поддубняк заявляет об отсутствии конфликта интересов. М.А. Асанов заявляет об отсутствии конфликта интересов. А.А. Ключева заявляет об отсутствии конфликта интересов. М.Ю. Синицкий заявляет об отсутствии конфликта интересов.

## Финансирование

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

## Информация об авторах

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

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

Хрячкова Оксана Николаевна, кандидат биологических наук научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-6620-5960

## Author Information Form

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

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

Hryachkova Oksana N., PhD, Researcher at the Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-6620-5960

*Поддубняк Алена Олеговна*, лаборант-исследователь лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-7388-356X

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

*Клюева Анастасия Александровна*, младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация; **ORCID** 0009-0008-8957-5041

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

*Poddubnyak Alena O.*, Laboratory Research Assistant at the Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-7388-356X

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

*Klueva Anastasia A.*, Researcher at the Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0009-0008-8957-5041

*Sinitsky Maxim Yu.*, PhD, Head of the Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental Medicine, Federal State Budgetary Institution “Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases”, Kemerovo, Russian Federation; **ORCID** 0000-0002-4467-8732

#### Вклад авторов в статью

*SAB* – получение, анализ и интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*XMB* – получение и интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*XOH* – получение и интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

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

*AMA* – интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*KAA* – интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

*CMYU* – получение, анализ и интерпретация данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

#### Author Contribution Statement

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

*KhMV* – data collection and interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

*HON* – data collection and interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

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

*AMA* – data interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

*KAA* – data interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

*SMYU* – data collection, analysis and interpretation, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Alexander Y., Osto E., Schmidt-Trucksäss A., Shechter M., Trifunovic D., Duncker D.J., Aboyans V., Bäck M., Badimon L., Cosentino F., De Carlo M., Dorobantu M., Harrison D.G., Guzik T.J., Hofer I., Morris P.D., Norata G.D., Suades R., Taddei S., Vilahur G., Waltenberger J., Weber C., Wilkinson F., Bochaton-Piallat M.L., Evans P.C. Endothelial function in cardiovascular medicine: a consensus paper of the European Society of Cardiology Working Groups on Atherosclerosis and Vascular Biology, Aorta and Peripheral Vascular Diseases, Coronary Pathophysiology and Microcirculation, and Thrombosis. *Cardiovasc Res.* 2021;117(1):29-42. doi: 10.1093/cvr/cvaa085.
2. Gao Y., Galis Z. S. Exploring the Role of Endothelial Cell Resilience in Cardiovascular Health and Disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2021;41(1):179–185. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314346
3. Podyacheva E., Danilchuk M., Toropova Y. Molecular mechanisms of endothelial remodeling under doxorubicin treatment. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine*

- & pharmacotherapie. 2023; 162: 114576. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114576
4. Feng J., Wu Y. Endothelial-to-Mesenchymal Transition: Potential Target of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2023; 23: 231–246. doi: 10.1007/s40256-023-00573-w
  5. Clayton Z. S., Brunt V. E., Hutton D. A., VanDongen N. S., D'Alessandro A., Reisz J. A., Ziembra B. P., Seals D. R. Doxorubicin-Induced Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Conduit Arteries Is Prevented by Mitochondrial-Specific Antioxidant Treatment. *JACC. CardioOncology*. 2020; 2(3): 475–488. doi: 10.1016/j.jaccao.2020.06.010
  6. Bosman M., Favere K., Neutel C. H. G., Jacobs G., De Meyer G. R. Y., Martinet W., Van Craenenbroeck E. M., Guns P. D. F. Doxorubicin induces arterial stiffness: A comprehensive in vivo and ex vivo evaluation of vascular toxicity in mice. *Toxicology letters*. 2021; 346: 23–33. doi:10.1016/j.toxlet.2021.04.015
  7. He H., Wang L., Qiao Y., Zhou Q., Li H., Chen S., Yin D., Huang Q., He M. Doxorubicin Induces Endotheliotoxicity and Mitochondrial Dysfunction via ROS/eNOS/NO Pathway. *Front Pharmacol*. 2020;10:1531. doi: 10.3389/fphar.2019.01531.
  8. Galán-Arriola C., Vélchez-Tschischke J.P., Lobo M., López G.J., de Molina-Iracheta A., Pérez-Martínez C., Villena-Gutiérrez R., Macías Á., Díaz-Rengifo I.A., Oliver E., Fuster V., Sánchez-González J., Ibanez B. Coronary microcirculation damage in anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Res*. 2022; 118(2):531–541. doi: 10.1093/cvr/cvab053.
  9. Kutikhin A. G., Shishkova D. K., Velikanova E. A., Sinitsky M. Y., Sinitskaya A. V., Markova V. E. Endothelial dysfunction in the context of blood–brain barrier modeling. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2022; 58(3): 781–806.
  10. Bosman M., Krüger D., Van Assche C., Boen H., Neutel C., Favere K., Franssen C., Martinet W., Roth L., De Meyer G. R. Y., Cillero-Pastor B., Delru, L., Heggermont W., Van Craenenbroeck E. M., Guns P. J. Doxorubicin-induced cardiovascular toxicity: a longitudinal evaluation of functional and molecular markers. *Cardiovascular research*. 2023; 119(15): 2579–2590. doi: 10.1093/cvr/cvad136
  11. Fu H.Y., Sanada S., Matsuzaki T., Liao Y., Okuda K., Yamato M., Tsuchida S., Araki R., Asano Y., Asanuma H., Asakura M., French B.A., Sakata Y., Kitakaze M., Minamino T. Chemical endoplasmic reticulum chaperone alleviates doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *CircRes*. 2016; 118: 798–809. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307604?
  12. Songbo M., Lang H., Xinyong C., Bin X., Ping Z., Liang S. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicology letters*. 2019; 307:41–48. doi:10.1016/j.toxlet.2019.02.013
  13. Pan J.A., Tang Y., Yu J.Y., Zhang H., Zhang J.F., Wang C.Q., Gu J. miR-146a attenuates apoptosis and modulates autophagy by targeting TAF9b/P53 pathway in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cell Death Dis*. 2019; 10:1–15. doi: 10.1038/s41419-019-1901-x
  14. Barachini S., Ghelardoni S., Varga Z. V., Mehanna R. A., Montt-Guevara M. M., Ferdinandy P., Madonna R. Antineoplastic drugs inducing cardiac and vascular toxicity—An update. *Vascular Pharmacology*. 2023; 153: 107223. doi: 10.1016/j.vph.2023.107223
  15. Crocco M., d'Annunzio G., La Valle A., Piccolo G., Chiarenza D. S., Bigatti C., Molteni M., Milanaccio C., Garrè M. L., Di Iorgi N., Maghnie M. (2021). Endothelial Dysfunction in Childhood Cancer Survivors: A Narrative Review. *Life (Basel, Switzerland)*. 2021; 12(1): 45. doi:10.3390/life12010045
  16. O'Riordan E., Chen J., Brodsky S.V., Smirnova I., Li H., Goligorsky M.S. Endothelial cell dysfunction: the syndrome in making. *Kidney Int*. 2005; 67(5): 1654–1658. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00256.x
  17. Chen P.Y., Qin L., Baeyens N., Li G., Afolabi T., Budatha M., Tellides G., Schwartz M.A., Simons M. Endothelial-to-mesenchymal transition drives atherosclerosis progression. *J Clin Invest*. 2015; 125(12): 4514–4528. doi:10.1172/JCI82719
  18. Cahill P.A., Redmond E.M. Vascular endothelium – Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016; 248:97–109. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007
  19. Sinitsky M.Y., Sinitskaya A.V., Khutornaya M.V., Asanov M.A., Shishkova D.K., Poddubnyak A.O., Ponasenko A.V. Genotoxic Stress As a Trigger of Endothelial Dysfunction in Wistar Rats: a Molecular Genetic Study. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2024; 60 (2): 768–779. doi: 10.1134/S00220930240202
  20. Jackson A.O., Zhang J., Jiang Z., Yin K. Endothelial-to-mesenchymal transition: A novel therapeutic target for cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med*. 2017; 27(6): 383–393. doi:10.1016/j.tcm.2017.03.003
  21. Davies P.F., Civelek M., Fang Y., Fleming I. The atherosusceptible endothelium: endothelial phenotypes in complex haemodynamic shear stress regions in vivo. *Cardiovasc Res*. 2013; 99: 315–327. doi: 10.1093/cvr/cvt101

**Для цитирования:** Синицкая А.В., Хуторная М.В., Хрячкова О.Н., Поддубняк А.О., Асанов М.А., Ключева А.А., Синицкий М.Ю. Молекулярно-генетический ответ эндотелиальных клеток на воздействие доксорубина: результаты экспериментов in vitro и in vivo. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2024;13(4S): 97–106. DOI: 10.17802/2306-1278-2024-13-4S-97-106

**To cite:** Sinitskaya A.V., Khutornaya M.V., Hryachkova O.N., Poddubnyak A.O., Asanov M.A., Klueva A.A., Sinitsky M.Yu. Molecular genetic response of endothelial cells to doxorubicin exposure: results of in vitro and in vivo study. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2024;13(4S): 97–106. DOI: 10.17802/2306-1278-2024-13-4S-97-106