

ISSN 1607-419X
ISSN 2411-8524 (Online)
УДК 576.08:616.24:
616.12-008.331:616-092.9



Секвенирование РНК легочной ткани на фоне легочной артериальной гипертензии выявило нарушения в бронхиальном эпителии в экспериментальной модели на крысах

Н. С. Вахрушев¹, А. А. Карпов¹, Л. А. Шиленко¹,
Н. П. Исакова^{1, 2}, В. В. Карпенко¹, А. С. Душкова¹,
Е. В. Семенова¹, Д. Д. Ваулина¹, М. М. Галагудза¹,
А. А. Костарева¹, О. В. Калинина¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Ваулина Дария Дмитриевна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: uplavice@gmail.com

Статья поступила в редакцию
21.01.25 и принята к печати 18.03.25.

Резюме

Актуальность. Легочная артериальная гипертензия (ЛАГ) — опасное для жизни заболевание, характеризующееся выраженным ремоделированием сосудистой стенки, нарушением ангиогенеза и асептическим воспалением ветвей легочной артерии. Все эти изменения приводят к правожелудочковой сердечной недостаточности, являющейся причиной смерти у пациентов с ЛАГ. Считается, что основной причиной нарушения дыхательных функций, возникающих при легочной гипертензии, являются сосудистые повреждения и недостаточность правого желудочка (ПЖ), тогда как изменения, происходящие в дыхательных путях, остаются вне поля зрения. **Цель работы** — исследовать изменения экспрессии генов в тканях легкого крыс с ЛАГ, вызванной введением монокроталина. **Материалы и методы.** В эксперименте было использовано 12 крыс-самцов стока Wistar. Для моделирования ЛАГ животным подкожно вводился раствор монокроталина (Sigma-Aldrich, США) в дозировке 60 мг/кг. Через 6 недель после введения монокроталина выполнялись исследования: катетеризация правого желудочка (ПЖ), гистологическое исследование бронхов и легочных артерий, генетический анализ. **Результаты.** Было обнаружено 298 дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), включая 107 с повышенной и 191 с пониженной экспрессией генов. Установлено, что наиболее выраженная дисрегуляция биологических процессов в кластере с повышенной экспрессией ДЭГ была ассоциирована с фагоцитозом, регуляцией иммунного ответа и клеточным ответом на липопротеины. В кластере с пониженной экспрессией ДЭГ были преимущественно представлены процессы, связанные с ресничками, их движением и сборкой, что указывает на связь с реснитчатым эпителием бронхов. Для подтверждения этого было выполнено гистологическое исследование бронхов. Полученные результаты демонстрируют значительные изменения морфологии бронхов диаметром от 100 до 1000 мкм: отмечалось значимое увеличение индекса толщины бронхиальной стенки (ЛАГ — 46,0 [38,8; 54,1] %, здоровые животные (Натив.) — 29,7 [24,8; 36,0] %, $p < 0,001$), высоты бронхиального эпителия (ЛАГ — 12,5 [11,0; 14,6] мкм, Натив. — 8,0 [7,2; 9,6] мкм, $p < 0,001$), а также количества эпителиоци-

тов на 50 мкм анализируемой стенки бронха (ЛАГ — 11,5 [10,7; 13,2], Натив. — 8,2 [7,7; 9,0], $p < 0,001$). **Заключение.** Таким образом, транскрипционное профилирование указало на процессы ремоделирования не только сосудов легких, но и нижних дыхательных путей, что было подтверждено гистологическим исследованием.

Ключевые слова: легочная артериальная гипертензия, ремоделирование бронхов, крысы, РНК секвенирование

Для цитирования: Вахрушев Н. С., Карпов А. А., Шиленко Л. А., Исакова В. В., Карпенко Н. П., Душкова А. С., Семенова Е. В., Ваулина Д. Д., Галагудза М. М., Костарева А. А., Калинина О. В. Секвенирование РНК легочной ткани на фоне легочной артериальной гипертензии выявило нарушения в бронхиальном эпителии в экспериментальной модели на крысах. Артериальная гипертензия. 2025;31(1):34–46. <https://doi.org/10.18705/1607-419X-2025-2479>. EDN: WARFVO

Lung tissue RNA sequencing shows dysregulation of the bronchial epithelium in a rat model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension

N. S. Vachrushev¹, A. A. Karpov¹, L. A. Shilenko¹,
N. P. Isakova^{1,2}, V. V. Karpenko¹, A. S. Dushkova¹,
E. V. Semenova¹, D. D. Vaulina¹, M. M. Galagudza¹,
A. A. Kostareva¹, O. V. Kalinina¹

¹ Almazov National Medical Research Centre,
St Petersburg, Russia

² Herzen State Pedagogical University of Russia,
St Petersburg, Russia

Corresponding author:

Vaulina Dariya Dmitrievna,
Almazov National Medical Center,
2 Akkuratov str., St Petersburg,
197341 Russia.
E-mail: uplavice@gmail.com

Received 21 January 2025;
accepted 18 March 2025.

Abstract

Background. Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a life-threatening disease characterized by severe vascular wall remodeling, impaired angiogenesis, and aseptic inflammation of the pulmonary artery branches. All these changes lead to right ventricular heart failure, which is the cause of death in patients with PAH. Vascular damage and right ventricular failure are considered the main cause of respiratory dysfunction in pulmonary hypertension. However, changes in the respiratory tract remain largely unnoticed. **The aim** of this study was to investigate changes in gene expression in the lung tissue of rats with PAH induced by monocrotaline administration. **Materials and methods.** Wistar male rats ($n = 12$) were used in the experiment. To simulate PAH, animals were subcutaneously injected with a monocrotaline solution (Sigma-Aldrich, USA) at a dosage of 60 mg/kg. Six weeks after administration of monocrotaline, studies were performed: right ventricular catheterization (RV), histological examination of bronchi and pulmonary arteries, genetic analysis. **Results.** Totally 298 differentially expressed genes (DEGs) were detected, including 107 with increased and 191 with decreased gene expression. The most pronounced dysregulation of biological processes in the cluster with increased DEG expression was associated with phagocytosis, regulation of the immune response, and cellular response to lipoproteins. In the decreased DEG expression cluster, processes associated with cilia, their movement, and assembly were predominantly represented, indicating a connection with the ciliated epithelium of the bronchi. To confirm this, a histological study of the bronchi was performed. The obtained results demonstrate significant changes in the morphology of bronchi with a diameter from 100 to 1000 μm : a significant increase in the bronchial wall thickness index (PAH — 46,0 [38,8; 54,1] %, healthy animals (Intact) — 29,7 [24,8; 36,0] %, $p < 0,001$), the height of bronchial epithelium (PAH —

12,5 [11,0; 14,6] μm , Intact — 8,0 [7,2; 9,6] μm , $p < 0,001$), as well as the number of epithelial cells per 50 μm of the analyzed bronchial wall (PAH — 11,5 [10,7; 13,2], Intact — 8,2 [7,7; 9,0], $p < 0,001$). **Conclusions.** Thus, transcriptional profiling indicated remodeling processes not only of the pulmonary vessels, but also of the lower respiratory tract, which was confirmed by histological examination.

Keywords: pulmonary arterial hypertension, bronchial remodeling, rats, RNA sequencing

For citation: Vachrushev NS, Karpov AA, Shilenko LA, Isakov NP, Karpenko VV, Dushkova AS, Semenova EV, Vaulina DD, Galagudza MM, Kostareva AA, Kalinina OV. Lung tissue RNA sequencing shows dysregulation of the bronchial epithelium in a rat model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. Arterial'naya Gipertenziya = Arterial Hypertension. 2025;31(1):34–46. <https://doi.org/10.18705/1607-419X-2025-2479>. EDN: WARFVO

Введение

Легочная гипертензия (ЛГ) — синдром, характеризующийся повышением среднего давления в легочной артерии более 20 мм рт. ст. в покое [1]. Целый ряд заболеваний может приводить к развитию ЛГ, в том числе патологии легких, левых камер сердца, а также при первичном поражении легочной артерии — легочной артериальной гипертензии (ЛАГ). ЛАГ — опасное для жизни заболевание, характеризующееся выраженным ремоделированием сосудистой стенки, нарушением ангиогенеза и асептическим воспалением ветвей легочной артерии. Все эти изменения в конечном итоге приводят к правожелудочковой сердечной недостаточности, которая является основной причиной смерти у пациентов с ЛАГ. Согласно статистическим данным, распространенность ЛАГ составляет приблизительно 1% в мировой популяции, но с каждым годом этот процент увеличивается [2]. Уровень выживаемости пациентов с ЛАГ на фоне проводимой ЛАГ-специфической терапии остается довольно низким (61,2–65,4%) в течение 5 лет [3]. Также у пациентов с ЛАГ нередко наблюдается снижение объема форсированного выдоха за первую секунду и жизненной емкости легких [4, 5]. Увеличенные легочные артерии могут механически сдавливать дыхательные пути, в то же время предполагается, что различные факторы воспаления и ремоделирования, выделяемые клетками поврежденных сосудов, активируют сигнальные пути в бронхах [6]. Однако механизм, лежащий в основе снижения функции легких на фоне ЛГ, достоверно не установлен.

Транскрипционное профилирование — один из современных и наиболее эффективных методов поиска новых мишеней для терапевтического воздействия. Этот подход благодаря оценке уровня РНК в заданной ткани позволяет выявлять молекулярные каскады и сигнальные пути, лежащие в основе патогенеза заболевания. Ранее при исследовании ЛАГ с помощью транскрипционного профилирования уже был выявлен ряд перспективных терапевтических мишеней, таких как ADGRG6 (рецептор адгезии G-белка G6) [7], Kng1 (кининоген 1) и

Fgg (гамма-цепь фибриногена) [8]. Оценка динамики экспрессии генов во времени в монокроталин-индуцированной модели ЛАГ указывает на участие сигнальных путей клеточного цикла [9] и взаимодействия цитокин–цитокиновый рецептор [10] в формировании и прогрессировании ЛАГ у крыс.

В данной работе было исследовано изменение экспрессии генов в тканях легких крыс с ЛАГ, вызванной введением монокроталина. Транскрипционное профилирование указало на процессы ремоделирования не только сосудов легких, но и нижних дыхательных путей, что было подтверждено гистологическим исследованием.

Материалы и методы

Животные

В эксперименте было использовано 12 крыс-самцов стока Wistar массой 220 ± 20 г. Животные содержались в стандартизированных условиях, имели свободный доступ к полнорационному гранулированному корму и воде.

Дизайн экспериментального моделирования ЛАГ

Животные были случайно разделены на две группы: ЛАГ ($n = 6$) и здоровые животные (Натив.; $n = 6$). Для моделирования ЛАГ животным подкожно вводился раствор монокроталина (Sigma-Aldrich, США) в дозировке 60 мг/кг. Группе здоровых животных подкожно вводился физиологический раствор в эквивалентном объеме.

Через 6 недель после введения монокроталина выполнялись исследования: катетеризация правого желудочка (ПЖ), гистологическое исследование бронхов и легочных артерий, генетический анализ.

Инвазивное измерение гемодинамики

Для наркотизации крыс использовался изофлуран, ингалируемый с помощью установки SomnoSuite Low-Flow Anesthesia System (Kent Scientific, Torrington, CT, США). Животные располагались на термостатируемом столике TCAT-2LV Animal Temperature Controller (Physitemp Instruments Inc., США). Искусственная вентиляция легких проводилась с помощью аппарата SAR-830/AP (CWE

Inc., США). Для регистрации сердечного выброса на восходящий отдел аорты устанавливался датчик объемного потока установки TS420 Perivascular Flow Module (Transonic, США). Для измерения систолического давления в правом желудочке (СДПЖ) проводилась пункция верхушки сердца. Регистрация давления осуществлялась с помощью монитора Mindray ePM 10 (Mindray, Китай).

Генетический анализ

Выделение РНК

Левое легкое животного промывалось 0,9-процентным раствором хлорида натрия, затем забиралось посмертно. Вся ткань левого легкого предварительно измельчалась, затем образцы разделялись на 3 пробы и подвергались мгновенной заморозке в жидком азоте для транспортировки. Дальнейшее хранение происходило при -80 градусах по Цельсию до момента использования. К замороженным образцам ткани легкого добавляли Extract RNA reagent (Evrogen, Россия) и в дальнейшем подвергали гомогенизации при помощи аппарата TissueLyzer (QIAGEN, Германия) в течение 5 минут при частоте 50 Гц. Далее выделение РНК проводили согласно инструкции производителя. Происходило разделение фаз хлороформом для отделения РНК от ДНК и белков. РНК осаждали изопропиловым спиртом и очищали 70-процентным этиловым спиртом. Качество и количество полученного РНК-материала оценивали с помощью аппарата NanoDrop 3300 SpectroPhotometer (Thermo Fisher Scientific, США) и на основании электрофореза в агарозном геле.

Подготовка библиотек и РНК-секвенирование

Один микрограмм (1 мкг) тотальной РНК, определенный при помощи флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США) (Assay Kit Q32852), был использован для синтеза библиотек при помощи Illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit (Illumina, США). Библиотеки были созданы в соответствии с инструкциями производителя. Количественная оценка библиотек проводилась с использованием набора Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, США). Качество библиотек оценивали набором Agilent High Sensitivity DNA kit (Agilent Technologies, США) при помощи системы Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США). Библиотеки мультиплексовывали, группировали и секвенировали на приборе NextSeq 2000 (Illumina, США) (100 циклов), как описано производителем, используя режим одностороннего считывания 1×50 п.н. со считыванием штрих-кода с индексом из восьми оснований.

Биоинформатический анализ

Bcl файлы, полученные после РНК-секвенирования, были конвертированы в fastq фор-

мат при помощи bcl2fastq конвертирующей программы v1.8.4 (Illumina, США). Для обработки данных секвенирования был использован алгоритм nf-core/rnaseq. Кратко, paired-end риды обрезали с помощью Trim Galore v0.6.7, последовательности рибосомных РНК удаляли при помощи SortMeRNA v4.3.4, риды выравнивали на геном крысы с помощью STAR v2.7.10a, дедупликацию выполняли через Picard v2.25.0 MarkDuplicates, а количество транскриптов определяли с использованием RSEM v1.3.3.

После того как было подсчитано количество ридов, соответствующих генам, использовали пакет DESeq2, реализованный на языке программирования R, для определения дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) между всеми группами. Значения p-value при определении ДЭГ были скорректированы с использованием поправки Бенджамини–Ходжберга и отфильтрованы с контролем частоты ложных открытий (FDR) = 0,1. Только гены с \log_2 -кратным (LFC) изменением более 1 считались дифференциально экспрессированными. Чтобы найти статистически значимо вовлеченные сигнальные пути, был проведен анализ fast gene set enrichment analysis (fgSEA) с использованием пакета fgsea R. Для описания функций изменяющихся процессов в экспериментальных группах было использовано сопоставление с двумя базами данных: 1) KEGG [11]; 2) Gene Ontology [12].

Гистологическое исследование

Для гистологической оценки использовалась нижняя доля правого легкого, которую предварительно фиксировали в 10-процентном растворе забуференного формалина. Доля равномерно разделялась на 4 поперечных уровня анализа. Парафиновые срезы толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилином-эозином. Исследование препаратов проводилось с помощью микроскопа Eclipse Ni-U (Nikon, Токио, Япония) при увеличении от $\times 5$ до $\times 40$. Результаты микроскопии оценивали с помощью программного обеспечения Nis Elements Br4 (Nikon, Токио, Япония). Для анализа использовались 3-й и 4-й поперечные уровни (нижняя половина легкого). Для подтверждения формирования легочной гипертензии производился анализ всех выявленных ветвей легочной артерии с внешним диаметром более 100 мкм. Определялся индекс гипертрофии сосудистой стенки, рассчитанный как отношение площади стенки к общей площади сосуда в процентах [13–15]. На микропрепаратах оценивались все обнаруженные бронхи диаметром от 100 до 1000 мкм и имеющие поперечное сечение. Для каждого из бронхов определялся средний диаметр (мкм), рассчитанный

как среднее арифметическое самого большого диаметра бронха и перпендикулярного к нему диаметра, и индекс толщины бронхиальной стенки, представляющий собой отношение площади бронхиальной стенки к общей площади бронха в процентах. Для анализа состояния бронхиального эпителия использовали показатели плотности расположения эпителиальных клеток и высоты эпителия. Для этого на поперечных срезах бронхов выбирали участки длиной 50 мкм в количестве от 2 до 4 (в зависимости от размера бронха). В каждом из этих участков определяли количество эпителиальных клеток. После этого вычисляли среднее количество клеток на отрезок у исследуемого бронха. Для определения высоты эпителиальных клеток в каждом из указанных 50 мкм отрезков в произвольно выбранных местах проводили по 3 измерения высоты эпителиоцитов (от базальной до апикальной поверхности клетки). После этого определяли среднюю высоту эпителиоцитов конкретного бронха.

Статистический анализ

Анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения R 4.2.2. Результаты представлены в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей (Me [Q1; Q3]). Учитывая ненормальное распределение в гистологических данных бронхов, различия по этим наборам данных проанализированы с использованием непараметрических тестов. Критерий Краскела–Уоллиса использован для определения общих различий между группами. Парные сравнения между группами выполнены с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. При анализе транскриптома статистически значимое отличие от контроля считалось при скорректированном значении $p < 0,05$.

Результаты

Выживаемость животных

В группе ЛАГ смертность составила 2 животных. Гибель наблюдалась на 5-й неделе эксперимента и была связана с формированием правожелудочковой сердечной недостаточности.

Инвазивное измерение гемодинамики

По результатам катетеризации ПЖ отмечалось повышение уровня СДПЖ в группе ЛАГ по сравнению со здоровыми животными (60,1 [41,5; 65,9] и 27,2 [24,4; 33,2] мм рт. ст. соответственно, $p = 0,01$). По данным отношения СДПЖ к сердечному выбросу, которое отражает легочное сосудистое сопротивление (ЛСС), было выявлено, что в группе ЛАГ этот показатель был выше, чем у здоровых животных (1,65 [1,1; 2,1] и 0,85 [0,8; 1,1] мм рт. ст./мл/мин соответственно, $p = 0,04$).

Дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ)

Гены, которые имеют $LFC > 1$ и скорректированное p -значение $> 0,05$, определены как дифференциально экспрессирующиеся по сравнению с группой здоровых животных. Всего обнаружено 298 ДЭГ, включая 107 с повышенной экспрессией и 191 с пониженной экспрессией. Тепловая карта отображает кластеризованный паттерн экспрессии генов между ЛАГ и здоровыми животными (рис. 1А). График Volcano отражает статистически значимые различия дифференциальной экспрессии между исследуемыми группами (рис. 1Б). Топ 5 генов с повышенной и пониженной экспрессией отображены в таблице.

KEGG-анализ

По данным KEGG-анализа, для ДЭГ с пониженной экспрессией в группе ЛАГ относительно группы здоровых животных определено 22 KEGG процесса, с повышенной — 17 (рис. 2). Примечательно, что изменение взаимодействия внеклеточного матрикса (ВКМ) с рецепторами обнаружено в обоих кластерах. Для определения паттерна экспрессии генов, вовлеченных в данный сигнальный путь, визуализировались ДЭГ. Обнаружено увеличение экспрессии лигандов ВКМ и одновременное снижение экспрессии части рецепторов, которые с ними взаимодействуют (рис. 3).

Анализ Gene Ontology

Анализ Gene Ontology использовался для определения биологических процессов, установленных на основании ДЭГ, сгруппированных по изменению экспрессии. Всего определено 466 биологических процессов по ДЭГ с повышенной экспрессией и 118 с пониженной, которые статистически значимо различаются между изучаемыми группами. Установлено, что наиболее выраженная дисрегуляция биологических процессов в кластере с повышенной экспрессией ДЭГ ассоциирована с фагоцитозом, регуляцией иммунного ответа и клеточным ответом на липопротеины (рис. 4А). В кластере с пониженной экспрессией ДЭГ из ТОП-20 преимущественно представлены процессы, связанные с ресничками, их движением и сборкой (рис. 4Б).

Гистологическое исследование

Средний диаметр проанализированных бронхов в группе здоровых животных составил 287 [228; 459] мкм, в группе моделирования ЛАГ — 251 [154; 458] мкм. Значимых различий между группами по этому показателю выявлено не было. При этом у животных из группы ЛАГ отмечалось значимое увеличение индекса толщины бронхиальной стенки (ЛАГ — 46,0 [38,8; 54,1] %, Натив. — 29,7 [24,8; 36,0] %, $p < 0,001$), высоты бронхиального эпителия (ЛАГ — 12,5 [11,0; 14,6] мкм, Натив. — 8,0 [7,2; 9,6]

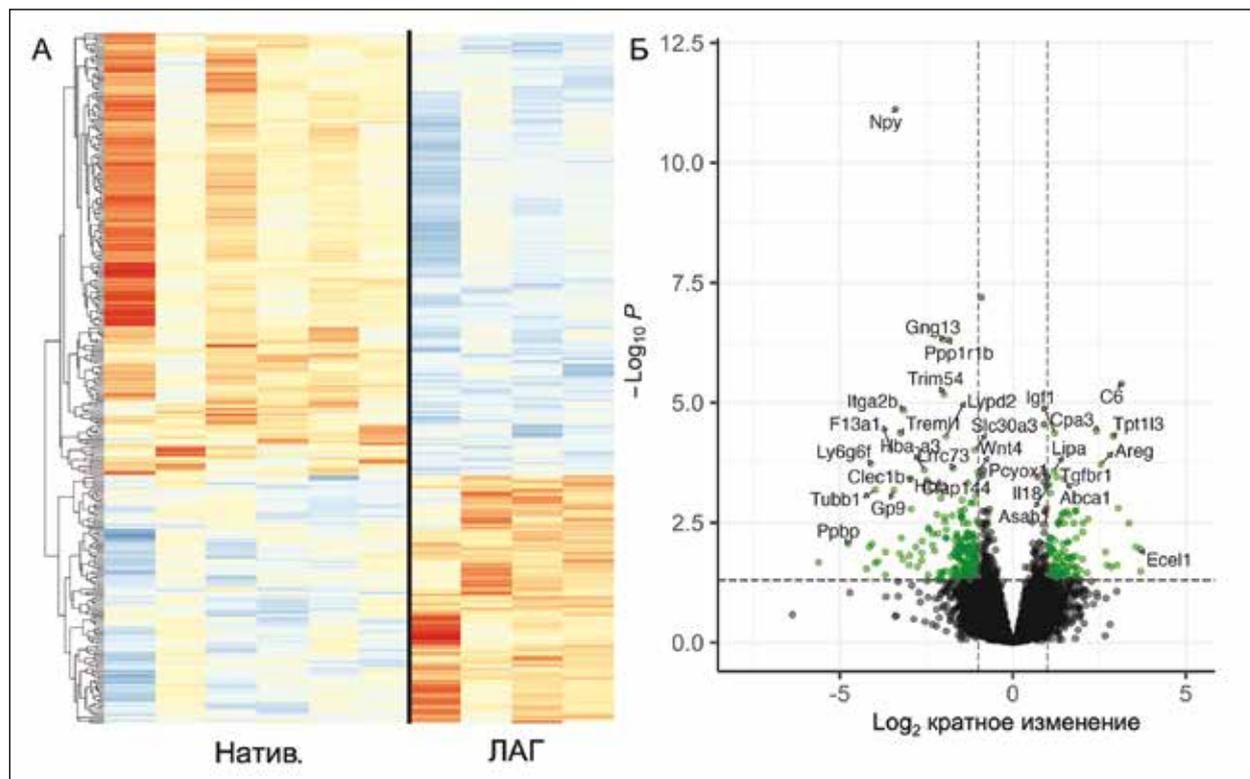


Рисунок 1. Идентификация дифференциально экспрессирующихся генов в модели легочной артериальной гипертензии

Примечание: А — тепловая карта 298 ДЭГ; Б — Volcano график; ДЭГ показаны зеленым цветом, каждая точка на графике отражает идентифицированный ген; ДЭГ — дифференциально экспрессирующиеся гены; Натив. — здоровые животные; ЛАГ — животные с моделируемой патологией — легочной артериальной гипертензией.

Таблица

ТОП-5 ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ ГЕНОВ С ПОВЫШЕННОЙ И ПОНИЖЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ, ОТСОРТИРОВАННЫЕ ПО LFC

Гены	ЛАГ	
	LFC	Скорректированное р-значение
Повышенная экспрессия		
Mcpt111	3,69	0,032
Ecel1	3,69	0,011
Mrgprb3	3,55	0,010
Ly49si111	3,35	0,003
C6	3,14	< 0,001
Пониженная экспрессия		
LOC120095489	-5,61	0,021
Ppbp	-4,75	0,008
Gp1bb	-4,23	0,028
LOC120099037	-4,14	0,010
Ly6g6f	-4,10	< 0,001

Примечание: LFC — логарифм кратного изменения; ЛАГ — легочная артериальная гипертензия; Mcpt111 — mast cell protease 1-like 1; ECEL1 — endothelin converting enzyme like 1; Mrgprb3 — MAS-related GPR; member B3; Ly49si111 — immunoreceptor Ly49si1 like 1; C6 — Complement component 6; LOC120095489 — small nucleolar RNA U3; PPBP — Pro-Platelet Basic Protein; Gp1bb — Glycoprotein Ib Platelet Subunit Beta; LY6G6F — Lymphocyte Antigen 6 Family Member G6F.

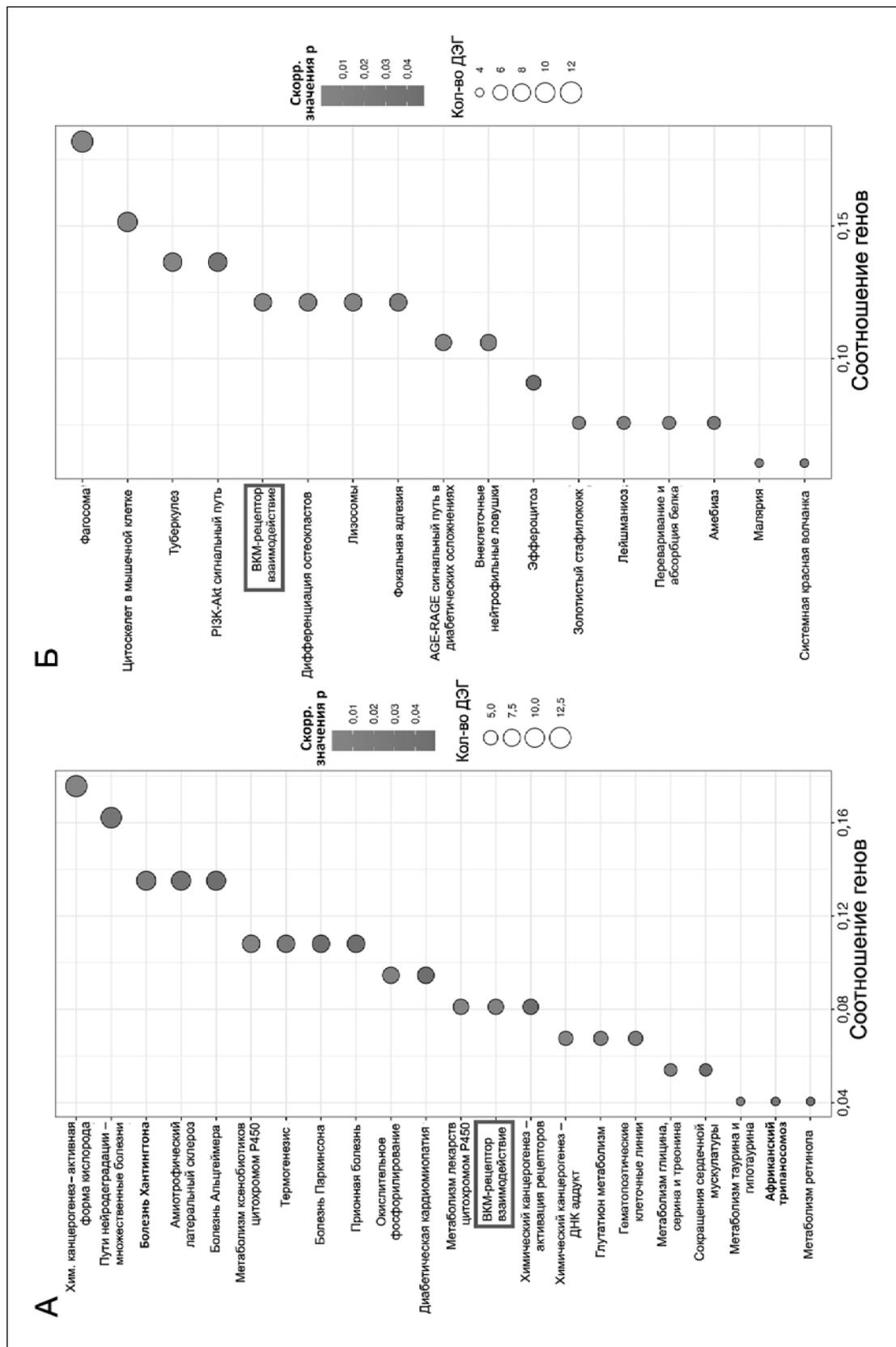


Рисунок 2. Сигнальные пути по данным KEGG-анализа, различающиеся между группами

Примечание: А — идентифицированные по ДЭГ с пониженной экспрессией; Б — идентифицированные по ДЭГ с повышенной экспрессией; ВКМ-рецептор взаимодействия — рецептор внеклеточного матрикса; AGE-RAGE сигнальный путь — конечный продукт усиленного гликозилирования (AGE); RAGE — рецептор к AGE; ДЭГ — дифференциально экспрессирующиеся гены.

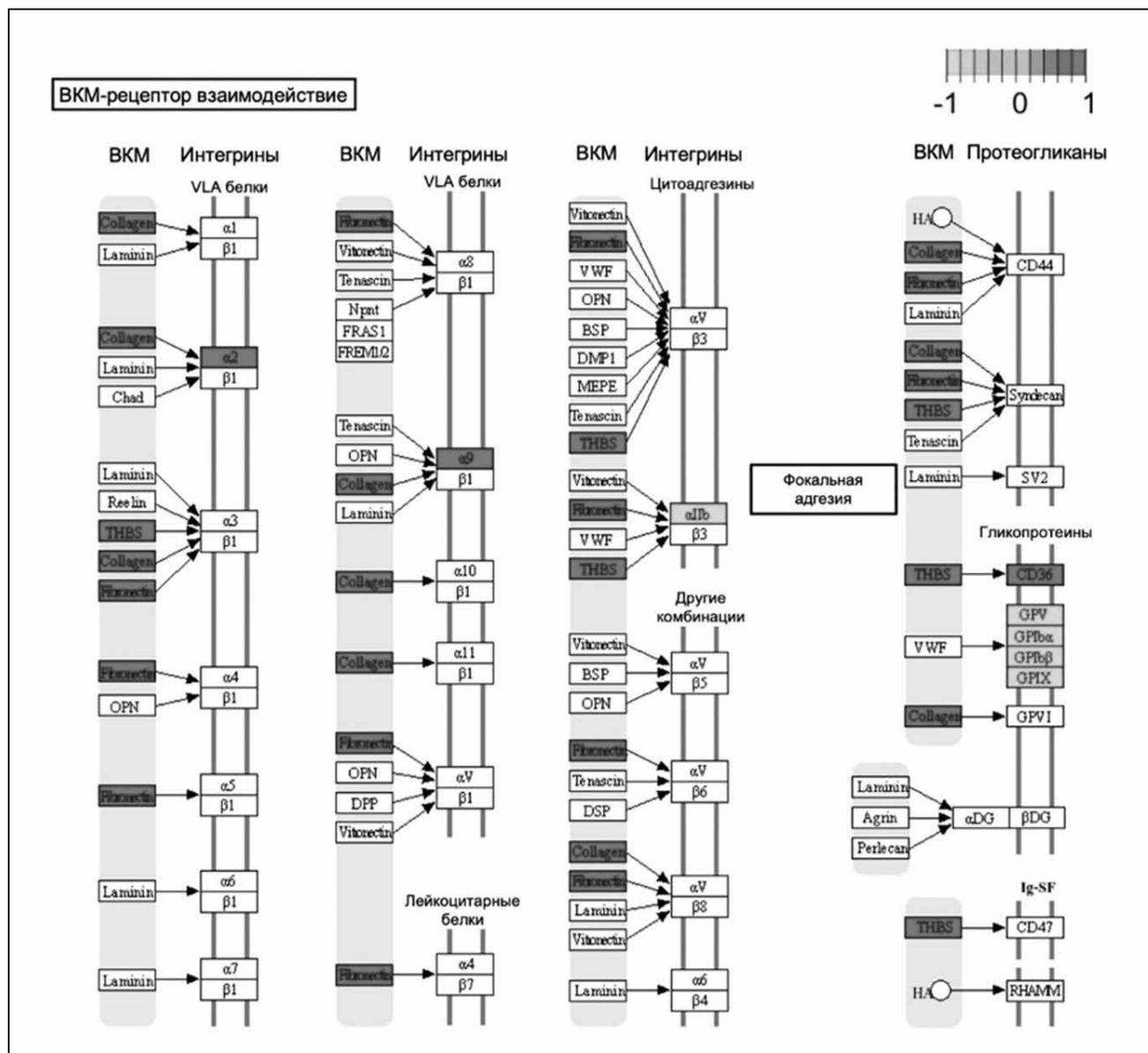


Рисунок 3. Карта путей по данным базы KEGG, отражающая взаимодействия внеклеточного матрикса с рецепторами

Примечание: дифференциально экспрессирующиеся гены с относительно повышенной и пониженной экспрессией показаны темно-серым и светло-серым цветом соответственно, тогда как белый цвет представляет фоновые гены.

мкм, $p < 0,001$), а также количества эпителиоцитов на 50 мкм анализируемой стенки бронха (ЛАГ — 11,5 [10,7; 13,2], Натив. — 8,2 [7,7; 9,0], $p < 0,001$) (рис. 5).

Индекс гипертрофии сосудистой стенки показал гипертрофическое ремоделирование ветвей легочной артерии в группе ЛАГ (63,0 [49,4; 82,0] %) по сравнению со здоровыми животными (25,4 [20,7; 30,2] %) ($p < 0,001$).

Обсуждение

В настоящем исследовании была смоделирована монокроталиновая ЛАГ на крысах, которая ха-

рактеризовалась стабильным повышением СДПЖ, ЛСС и значимым увеличением индекса гипертрофии сосудистой стенки ветвей легочной артерии по сравнению со здоровыми животными.

Прогрессирование ЛГ характеризуется сложной дисрегуляцией множества белков и сигнальных путей, что затрудняет разработку эффективных терапевтических подходов. Высокопроизводительное РНК-секвенирование представляет собой объективный и мощный инструмент для систематического скрининга дифференциально экспрессируемых генов, связанных с развитием ЛГ, способствуя более глубокому пониманию основных молекулярных

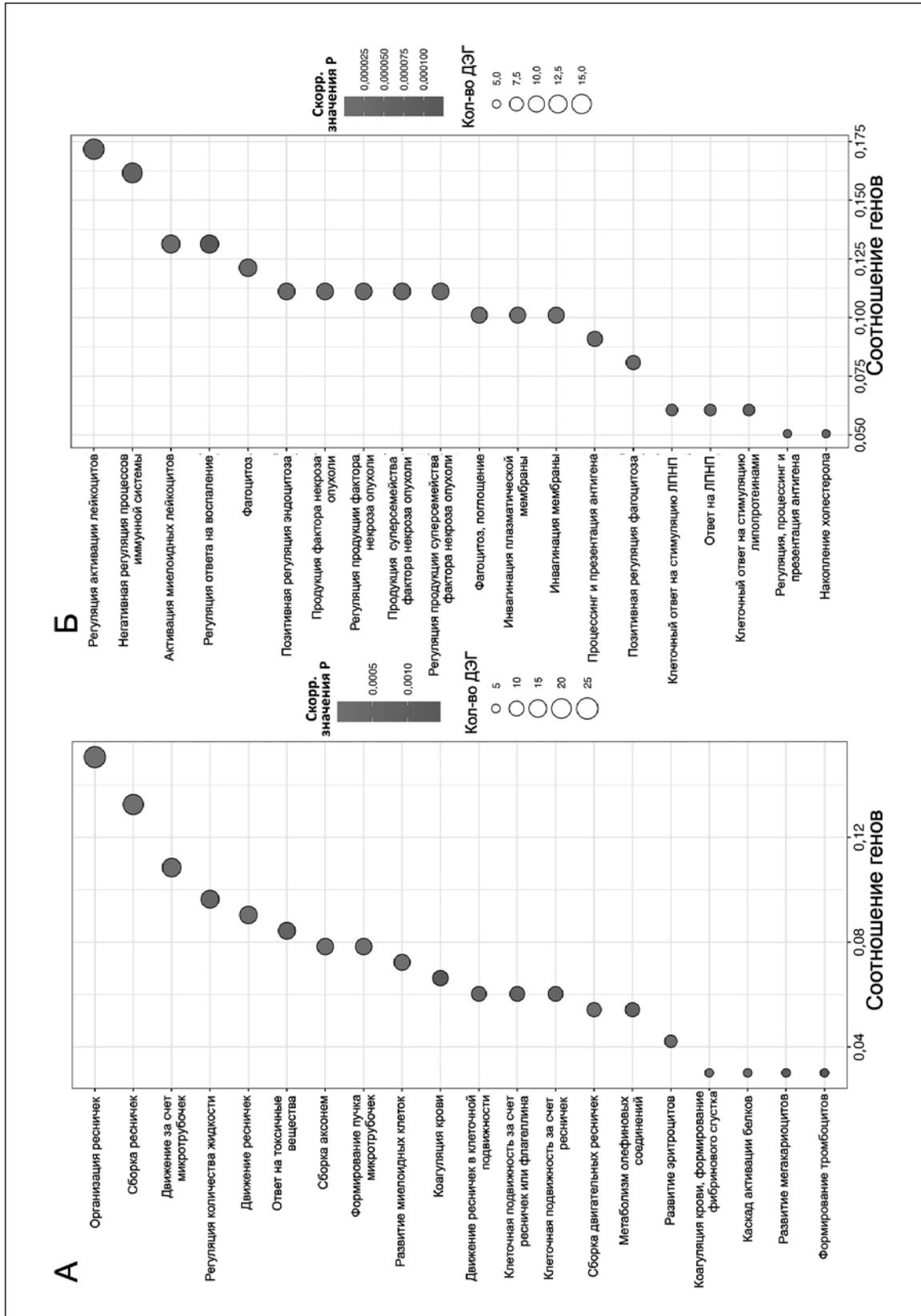


Рисунок 4. Топ-20 биологических процессов из базы Gene Ontology, различающихся между группами

Примечание: А — идентифицированные по ДЭГ с пониженной экспрессией в группе ЛАГ; Б — идентифицированные по ДЭГ с повышенной экспрессией; ЛПНП — липопротеины низкой плотности, ДЭГ — дифференциально экспрессирующиеся гены.

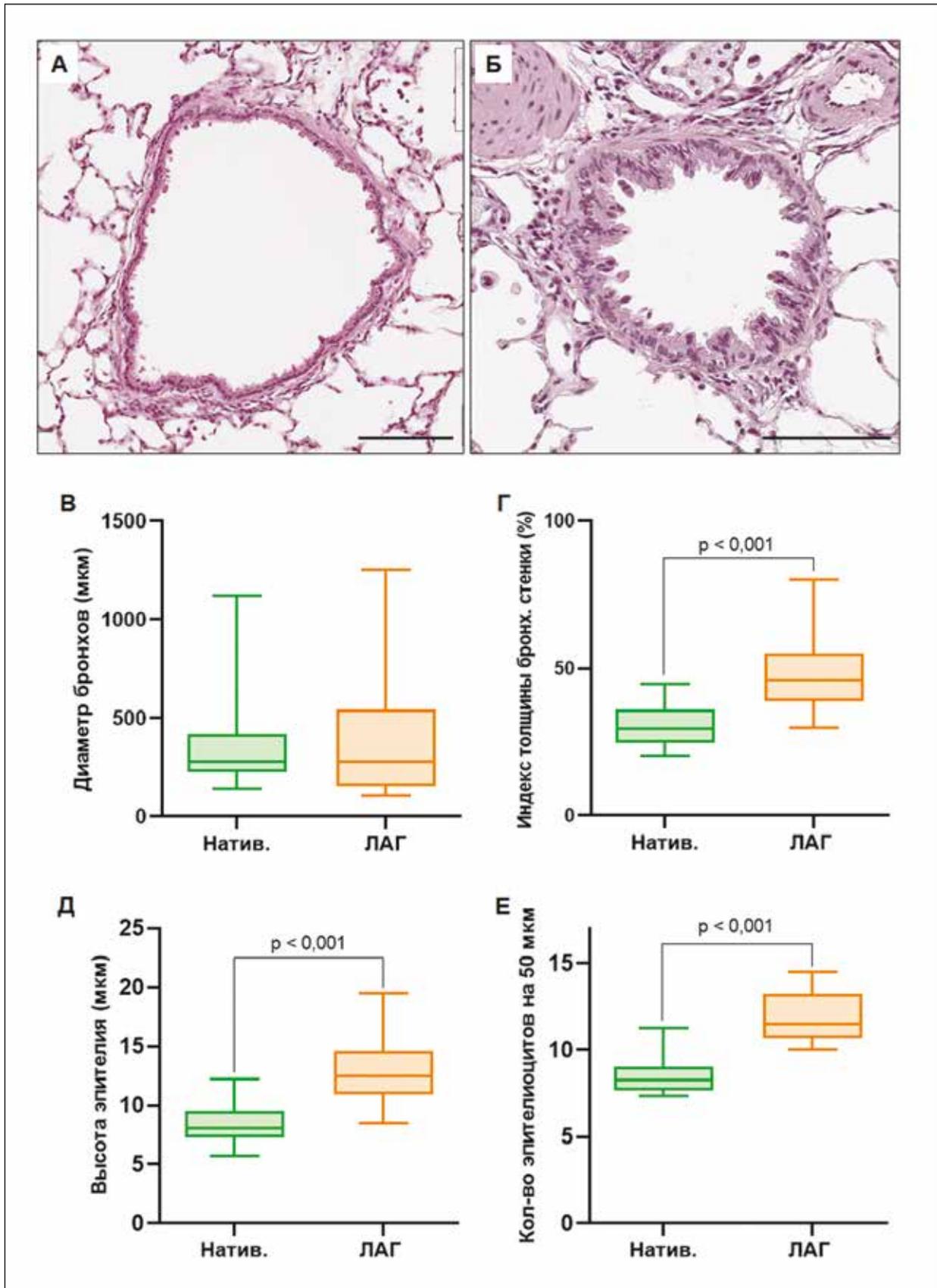


Рисунок 5. Результаты гистологического исследования бронхов

Примечание: А, Б — репрезентативные микрофотографии бронхов (bar = 100 мкм); А — бронх из группы здоровых животных, Б — бронх из группы ЛАГ; В — диаметр бронхов (мкм); Г — индекс толщины бронхиальной стенки в %; Д — высота эпителия (мкм); Е — количество эпителиоцитов на 50 мкм. Натив. — здоровые животные; ЛАГ — животные с моделируемой патологией.

механизмов этого заболевания. В данном исследовании мы охарактеризовали изменения в транскрипционном профиле цельного материала легких крыс со сформировавшейся ЛАГ, вызванной монокроталином, через шесть недель после индукции заболевания.

Было обнаружено 298 ДЭГ, включая 107 с повышенной и 191 с пониженной экспрессией генов. Снижение экспрессии основного протромбоцитарного белка (Prrbp, также известного как CXCL7) показано в аналогичных животных моделях ЛАГ [16], однако на материале клеток крови у пациентов с идиопатической ЛАГ обнаруживается повышенная экспрессия Prrbp [17]. Эндотелинпревращающий фермент типа 1 (Ecel1) имеет повышенную экспрессию в группе ЛАГ, что согласуется с данными секвенирования монокроталин-индуцированной ЛАГ, описанной в литературе [10]. Изменения в сигнальных путях по данным KEGG анализа: метаболизм ксенобиотиков цитохромом P450, взаимодействие экстрацеллюлярного матрикса с рецепторами, химический канцерогенез, системная красная волчанка — также идентифицировались в модели ЛАГ, вызванной гипоксией, что подчеркивает схожесть патогенеза, несмотря на разную этиологию [8]. Макрофаги инфильтрируют очаги поражения сосудов как у людей, так и в монокроталин-индуцированной модели ЛАГ [18,19]. Обнаруженная дисрегуляция биологических процессов, связанных с фагоцитозом и инвагинацией мембраны, свидетельствуют об активности макрофагов даже на 6-й неделе после введения монокроталина. У трансгенных мышей с избыточной экспрессией фактора некроза опухоли альфа (TNF α) развилась спонтанная ЛАГ. Кроме того, была показана роль TNF α в прогрессировании ЛАГ при подавлении экспрессии BMPR2 и изменении NOTCH каскада [20, 21]. Кроме того, были обнаружены изменения в метаболизме глутатиона, что согласуется с результатами ранее опубликованных исследований, в которых демонстрировалась способность глутатиона препятствовать токсическому эффекту метаболитов монокроталина в легких [22, 23]. Анализ Gene Ontology также выявил изменения в каскадах, связанных с TNF α . Кроме того, по результатам РНК-секвенирования настоящего исследования выявлены биологические процессы, ассоциированные с двигательными ресничками в кластере с пониженной экспрессией ДЭГ. Поскольку Foxj1, являющийся ключевым звеном в формировании двигательных ресничек из первичных ресничек в эпителиальных клетках бронхов [24], определен как ДЭГ, то был сделан вывод о дисрегуляции именно двигательных

ресничек. В цельном материале легкого двигательные реснички присутствуют только в реснитчатом эпителии бронхов, поэтому данные биологические процессы указывают на изменения, происходящие в дыхательных путях. Гистологическое исследование позволило выявить увеличение индекса толщины бронхиальной стенки и увеличение количества эпителиоцитов в эпителиальном слое бронхов у крыс с ЛАГ. Было обнаружено, что клетки бронхиального эпителия выше по сравнению с контрольной группой, что приводит к большему накоплению цитоплазмы и слизи. Наблюдаемые изменения могут соответствовать процессам, приводящим к ухудшению респираторных параметров и у пациентов с легочной гипертензией [25].

Предполагается, что основной причиной нарушения дыхательных функций, возникающих при легочной гипертензии, являются сосудистые повреждения и недостаточность ПЖ. В то же время изменения, происходящие в дыхательных путях, остаются вне поля зрения. Данные, полученные на монокроталин-индуцированной модели ЛАГ, демонстрируют значительные изменения морфологии бронхов диаметром от 100 до 1000 мкм, которые можно обнаружить только у пациентов при биопсии или после аутопсии, что еще раз подчеркивает релевантность животной модели.

Ограничением данного исследования является анализ транскриптома на органном уровне. Поскольку изучался материал из цельного легкого, анализ транскриптома описывает генерализованные изменения, что не позволяет дифференцировать ответ на введение монокроталина на уровне отдельных типов клеток.

Заключение

В данном исследовании были охарактеризованы процессы, лежащие в основе модели ЛАГ, индуцированной монокроталином. Исходя из анализа транскриптома, наиболее выраженные изменения наблюдаются в работе макрофагов и реснитчатого эпителия. Поскольку изучался материал цельного легкого, то данные, полученные в ходе РНК-секвенирования, описывают общие изменения в легких. Обнаруженное ремоделирование дыхательных путей указывает на связь ЛГ и снижения дыхательных функций у пациентов.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование/Funding

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23–75–10122. / This work was supported by the Russian Science Foundation grant № 23–75–10122.

Список литературы / References

- Humbert M, Kovacs G, Hoeper MM, Badagliacca R, Berger RMF, Brida M, et al. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J*. 2022;43(38):3618–731. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac237>
- Hoeper MM, Humbert M, Souza R, Idrees M, Kawut SM, Sliwa-Hahnle K, et al. A global view of pulmonary hypertension. *Lancet Respir Med*. 2016;4(4):306–22. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00543-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00543-3)
- Farber HW, Miller DP, Poms AD, Badesch DB, Frost AE, Rouzic EML, et al. Five-year outcomes of patients enrolled in the REVEAL Registry. *Chest*. 2015;148(4):1043–54. <https://doi.org/10.1378/chest.15-0300>
- Rahaghi FN, Trieu M, Shaikh F, Abtin F, Diaz AA, Liang LL, et al. Evolution of obstructive lung function in advanced pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2021;204(12):1478–81. <https://doi.org/10.1164/rccm.202105-1169LE>
- Jing ZC, Xu XQ, Badesch DB, Jiang X, Wu Y, Liu JM, et al. Pulmonary function testing in patients with pulmonary arterial hypertension. *Respir Med*. 2009;103(8):1136–42. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2009.03.009>
- Lee MH, Graham BB, Bull TM. Double trouble: airflow and pulmonary vascular obstruction. *Am J Respir Crit Care Med*. 2021;204(12):1365–7. <https://doi.org/10.1164/rccm.202109-2153ED>
- Gorr MW, Sriram K, Muthusamy A, Insel PA. Transcriptomic analysis of pulmonary artery smooth muscle cells identifies new potential therapeutic targets for idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Br J Pharmacol*. 2020;177(15):3505–18. <https://doi.org/10.1111/bph.15074>
- Zhang L, Chen S, Zeng X, Lin D, Li Y, Gui L, et al. Revealing the pathogenic changes of PAH based on multiomics characteristics. *J Transl Med*. 2019;17(1):231. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1981-5>
- Luo A, Hao R, Zhou X, Jia Y, Bao C, Yang L, et al. Transcriptomic profiling highlights cell proliferation in the progression of experimental pulmonary hypertension in rats. *Sci Rep*. 2024;14(1):14056. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-64251-w>
- Xiao G, Wang T, Zhuang W, Ye C, Luo L, Wang H, et al. RNA sequencing analysis of monocrotaline-induced PAH reveals dysregulated chemokine and neuroactive ligand receptor pathways. *Aging*. 2020;12(6):4953–69. <https://doi.org/10.18632/aging.102922>
- Kanehisa M. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Harris MA, Clark J, Ireland A, Lomax J, Ashburner M, Foulger R, et al. Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(90001):258D–261. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh036>
- Kitagawa MG, Reynolds JO, Wehrens XHT, Bryan RM, Pandit LM. Hemodynamic and pathologic characterization of the TASK-1–/– mouse does not demonstrate pulmonary hypertension. *Front Med*. 2017;4:177. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00177>
- Karpov AA, Vachrushev NS, Shilenko LA, Smirnov SS, Bunenkov NS, Butskih MG, et al. Sympathetic denervation and pharmacological stimulation of parasympathetic nervous system prevent pulmonary vascular bed remodeling in rat model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2023;10(2):40. <https://doi.org/10.3390/jcdd10020040>
- Karpov AA, Anikin NA, Mihailova AM, Smirnov SS, Vaulina DD, Shilenko LA, et al. Model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension in rats caused by repeated intravenous administration of partially biodegradable sodium alginate microspheres. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3):1149. <https://doi.org/10.3390/ijms22031149>
- Mathew R, Huang J, Iacobas S, Iacobas DA. Pulmonary hypertension remodels the genomic fabrics of major functional pathways. *Genes*. 2020;11(2):126. <https://doi.org/10.3390/genes11020126>
- Chen Y, Ouyang T, Yin Y, Fang C, Tang C, Jiang L, et al. Identification of immune-related hub genes and analysis of infiltrated immune cells of idiopathic pulmonary artery hypertension. *Front Cardiovasc Med*. 2023;10:1125063. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1125063>
- Zhuang W, Lian G, Huang B, Du A, Xiao G, Gong J, et al. Pulmonary arterial hypertension induced by a novel method: twice-intraperitoneal injection of monocrotaline. *Exp Biol Med*. 2018;243(12):995–1003. <https://doi.org/10.1177/1535370218794128>
- Zhang MQ, Wang CC, Pang XB, Shi JZ, Li HR, Xie XM, et al. Role of macrophages in pulmonary arterial hypertension. *Front Immunol*. 2023;14:1152881. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1152881>
- Hurst LA, Dunmore BJ, Long L, Crosby A, Al-Lamki R, Deighton J, et al. TNF α drives pulmonary arterial hypertension by suppressing the BMP type-II receptor and altering NOTCH signalling. *Nat Commun*. 2017;8(1):14079. <https://doi.org/10.1038/ncomms14079>
- Fujita M, Shannon JM, Irvin CG, Fagan KA, Cool C, Augustin A, et al. Overexpression of tumor necrosis factor- α produces an increase in lung volumes and pulmonary hypertension. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280(1): L39–49. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.280.1.L39>
- Jin HF, Du SX, Zhao X, Wei HL, Wang YF, Liang YF, et al. Effects of endogenous sulfur dioxide on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2008;29(10):1157–66. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00864.x>
- Yan CC, Huxtable RJ. Effects of monocrotaline, a pyrrolizidine alkaloid, on glutathione metabolism in the rat. *Biochem Pharmacol*. 1996;51(3):375–9. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)02189-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)02189-2)
- Jain R, Pan J, Driscoll JA, Wisner JW, Huang T, Gunsten SP, et al. Temporal relationship between primary and motile ciliogenesis in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;43(6):731–9. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0328OC>
- Low AT, Medford ARL, Millar AB, Tulloh RMR. Lung function in pulmonary hypertension. *Respir Med*. 2015;109(10): 1244–9. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2015.05.022>

Вклад авторов

Н. С. Вахрушев — разработка дизайна исследования, сбор данных, анализ данных, статистическая обработка данных, написание текста рукописи; А. А. Карпов — концепция исследования, научное редактирование, критический обзор; Л. А. Шиленко — сбор данных, анализ данных, сопровождение программного обеспечения; Н. П. Исакова — анализ данных, статистическая обработка данных, критический обзор; В. В. Карпенко — разработка дизайна исследования, редактирование текста, сопровождение программного обеспечения; А. С. Душкова — редактирование текста, сопровождение программного обеспечения; Е. В. Семенова — разработка дизайна исследования, сбор данных; Д. Д. Ваулина — редактирование

текста, анализ данных; М. М. Галагудза — концепция исследования, научное редактирование, научное руководство; А. А. Костарева — критический обзор, научное руководство; О. В. Калинина — концепция исследования, научное редактирование, утверждение текста рукописи.

Author contributions

N. S. Vachrushev — study design development, data acquisition, data analysis, statistical data processing, drafting the manuscript; A. A. Karpov — study concept, scientific editing, critical review; L. A. Shilenko — data acquisition, data analysis, software support; N. P. Isakova — data analysis, statistical data processing, critical review; V. V. Karpenko — study design development, draft editing, software support; A. S. Dushkova — draft editing, software support; E. V. Semenova — study design development, data acquisition; D. D. Vaulina — draft editing, data analysis; M. M. Galagudza — study concept, scientific editing, supervision; A. A. Kostareva — critical review, supervision; O. V. Kalinina — study concept, scientific editing, draft adoption.

Информация об авторах

Вахрушев Никита Сергеевич — лаборант-исследователь НИЛ патологии малого круга кровообращения ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, ORCID: 0000-0001-8567-0879, e-mail: ladvakhrushev@gmail.com;

Карпов Андрей Александрович — кандидат медицинских наук, заведующий НИЛ патологии малого круга кровообращения ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, ORCID: 0000-0003-0114-5896, e-mail: karpov_aa@almazovcentre.ru;

Шиленко Леонид Алексеевич — ординатор кафедры факультетской терапии с клиникой, лаборант-исследователь НИЛ патологии малого круга кровообращения ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, ORCID: 0000-0002-1002-9419, e-mail: shilenko_la@almazovcentre.ru;

Исакова Надежда Петровна — кандидат биологических наук, младший научный сотрудник НИЛ патологии малого круга кровообращения ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, доцент кафедры зоологии и генетики РГПУ им. А. И. Герцена, ORCID: CWF-1961-2022;

Карпенко Владислава Валерьевна — лаборант-исследователь НИЛ патологии малого круга кровообращения ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, ORCID: 0009-0003-2207-1918;

Душкова Анна Сергеевна — студент ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, ORCID: 0009-0001-7465-2402, e-mail: dushkova_as@almazovcentre.ru;

Семёнова Екатерина Васильевна — студент ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, ORCID: 0009-0008-7005-2267, e-mail: semenova_ev@almazovcentre.ru;

Вавулина Дария Дмитриевна — младший научный сотрудник НИЛ патологии малого круга кровообращения ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, ORCID: 0000-0003-1088-2396, e-mail: uplavice@gmail.com;

Галагудза Михаил Михайлович — доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, ORCID 0000-0001-5129-9944, e-mail: galagudza_mm@almazovcentre.ru;

Костарева Анна Александровна — доктор медицинских наук, директор Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, ORCID: 0000-0002-9349-6257, e-mail: Kostareva_aa@almazovcentre.ru;

Калинина Ольга Викторовна — доктор биологических наук, профессор кафедры лабораторной медицины и гене-

тики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, ORCID: 0000-0003-1916-5705, e-mail: kalinina_ov@almazovcentre.ru.

Author information

Nikita S. Vakhrushev, Laboratory Assistant, Laboratory of Pulmonary Circulation Pathology, Almazov National Medical Research Centre, ORCID: 0000-0001-8567-0879, e-mail: ladvakhrushev@gmail.com;

Andrei A. Karpov, MD, PhD, Head, Laboratory of Pulmonary Circulation Pathology, Associate Professor, Department of Pathology, Almazov National Medical Research Centre, ORCID: 0000-0003-0114-5896, e-mail: karpov_aa@almazovcentre.ru;

Leonid A. Shilenko, MD, Resident, Department of Internal Diseases, Laboratory Assistant, Laboratory of Pulmonary Circulation Pathology, Almazov National Medical Research Centre, ORCID: 0000-0002-1002-9419, e-mail: shilenko_la@almazovcentre.ru;

Nadezhda P. Isakova, PhD in Biology Sciences, Junior Researcher, Laboratory of Pulmonary Circulation Pathology, Almazov National Medical Research Centre, Associate Professor, Zoology and Genetics Department, Herzen State Pedagogical University of Russia, ORCID: CWF-1961-2022;

Vladislava V. Karpenko, Laboratory Assistant, Laboratory of Pulmonary Circulation Pathology, Almazov National Medical Research Centre, ORCID: 0009-0003-2207-1918;

Anna S. Dushkova, Student, Almazov National Medical Research Centre, ORCID: 0009-0001-7465-2402, e-mail: dushkova_as@almazovcentre.ru;

Ekaterina V. Semenova, Student, Almazov National Medical Research Center, ORCID: 0009-0008-7005-2267, e-mail: semenova_ev@almazovcentre.ru;

Dariya D. Vaulina, Junior Researcher, Laboratory of Pulmonary Circulation Pathology, Almazov National Medical Research Centre, ORCID: 0000-0003-1088-2396, e-mail: uplavice@gmail.com;

Michael M. Galagudza, MD, PhD, DSc, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Science, Director, Institute of Experimental Medicine, Head, Department of Pathology, Institute of Medical Education, Almazov National Medical Research Centre, ORCID 0000-0001-5129-9944, e-mail: galagudza_mm@almazovcentre.ru;

Anna A. Kostareva, MD, PhD, DSc, Director, Institute of Molecular Biology and Genetics, Almazov National Research Medical Research Centre, ORCID: 0000-0002-9349-6257, e-mail: Kostareva_aa@almazovcentre.ru;

Olga V. Kalinina, Doctor of Biology Sciences, Professor, Department of Laboratory Medicine and Genetics, Almazov National Medical Research Centre, ORCID: 0000-0003-1916-5705, e-mail: kalinina_ov@almazovcentre.ru