
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**АНАЛИЗ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ЛЕГКИХ КРЫС
С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ТРОМБОЭМБОЛИЧЕСКОЙ
ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ**

© 2025 г. Н. С. Вахрушев^{1, *}, Л. А. Шиленко¹, А. А. Карпов^{1, 2}, Д. Ю. Ивкин²,
М. М. Галагудза¹, А. А. Костарева¹, О. В. Калинина^{1, 3}

¹Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет Минздрава
России, Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: drabrikos@gmail.com

Поступила в редакцию 05.06.2025 г.

После доработки 11.07.2025 г.

Принята к публикации 14.07.2025 г.

Хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия (ХТЭЛГ) остается тяжелым заболеванием с низкими показателями выживаемости у неоперабельных пациентов, несмотря на успехи в лечении. Молекулярные механизмы, лежащие в основе патогенеза ХТЭЛГ, не полностью изучены, что требует дальнейших исследований для выявления новых терапевтических мишеней. Несмотря на то, что разработано множество моделей ХТЭЛГ на животных, для установления их клинической значимости требуется демонстрация молекулярной биоэквивалентности с патофизиологическими процессами человека, в частности посредством соответствия профилей экспрессии генов. Цель работы – проанализировать дифференциальную экспрессию генов в тканях легких крыс при моделировании ХТЭЛГ введением альгинатных микросфер и оценить возможность применения данной модели для изучения новых терапевтических подходов при ХТЭЛГ. ХТЭЛГ была смоделирована у крыс линии Wistar с помощью повторных внутривенных инъекций биodeградируемых альгинатных микросфер. Транскрипционный профиль в образцах легочной ткани, взятых у крыс с ХТЭЛГ на 2-й и 6-й неделях, а также крыс контрольной группы, был проанализирован с помощью технологии высокопроцессивного секвенирования РНК. Дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ) были идентифицированы с использованием DESeq2. Валидацию изменения экспрессии генов проводили методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Транскриптомный анализ выявил, что при моделировании ХТЭЛГ на 2-й неделе повышалась экспрессия генов, связанных с воспалением, тогда как на 6-й неделе наблюдалось снижение экспрессии генов, ассоциированных с внеклеточным матриксом. Анализ факторов транскрипции выявил преимущественное регулирование промоторов ДЭГ белками семейства цинковых пальцев C2H2: Zfp278 и Klf5, что предполагает их участие в клеточном ответе при формировании ХТЭЛГ. Анализ экспрессии генов *Cav1*, *Eng*, *vWF*, *Gja5* методом ОТ-ПЦР на большей выборке образцов ткани легких подтвердил динамику изменения экспрессии, выявленную при анализе транскриптома. Проведенное исследование выявило динамические транскрипционные изменения при формировании ХТЭЛГ

у крыс, включая дисрегуляцию генов внеклеточного матрикса, воспаления и эндотелиальной дисфункции, что соответствует современным представлениям патогенеза ХТЭЛГ. Полученные данные демонстрируют сопоставимость разработанной животной модели на крысах с течением ХТЭЛГ у людей на уровне изменения транскрипционного профиля.

Ключевые слова: Хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия (ХТЭЛГ), ремоделирование сосудов, секвенирование РНК, воспаление, ОТ-ПЦР

DOI: 10.7868/S2658655X25110046

ВВЕДЕНИЕ

Легочная гипертензия (ЛГ) представляет собой синдром, при котором среднее давление в легочной артерии в состоянии покоя превышает 20 мм рт. ст. [1]. Развитие ЛГ может быть обусловлено различными патологиями, включая заболевания легких, поражение левых камер сердца и первичное повреждение легочных артерий или артериол. Одной из наиболее актуальных и недостаточно исследованных форм ЛГ считается хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия (ХТЭЛГ). Данное состояние развивается как осложнение тромбоэмболии легочной артерии (ТЭЛА) и характеризуется стойким повышением давления в легочной артерии вместе с неполным лизисом тромбоэмболов [2, 3]. Согласно данным различных регистров, частота возникновения ХТЭЛГ после ТЭЛА составляет от 0.79% до 15.3% [4, 5]. При этом до 30% пациентов с ХТЭЛГ не имеют указаний на перенесенную ТЭЛА или тромбоз глубоких вен [6], что указывает на сложность патогенеза данной патологии. Несмотря на значительный прогресс в развитии инвазивных методов лечения, таких как легочная эндартерэктомия (ЛЭЭ) и баллонная легочная ангиопластика, а также расширение возможностей медикаментозной терапии вазодилататорами, примерно 20–40% пациентов остаются неоперабельными для ЛЭЭ [3] либо имеют резидуальную ЛГ после вмешательства. Это обуславливает неблагоприятный прогноз у данной категории больных и подчеркивает необходимость поиска принципиально новых терапевтических мишеней.

К факторам риска развития ХТЭЛГ относятся системное воспаление, нарушения коагуляции, фибринолиза и активации тромбоцитов [7, 8]. Существенное значение в патогенезе имеет микроангиопатия, затрагивающая дистальные ветви легочной артерии, а также капилляры и вены малого круга кровообращения [9]. Морфологически данное состояние проявляется утолщением неоинтимы, фиброзом и пролиферацией фибромускулярной ткани [10–14]. Кроме того, при ХТЭЛГ наблюдается гипертрофия бронхиальных артерий и формирование коллатералей между сосудами малого и большого кругов кровообращения, что способствует усугублению микроангиопатии [9, 15].

Для выявления молекулярных механизмов и сигнальных путей, лежащих в основе патогенеза ХТЭЛГ, применяют транскриптомный анализ, позволяющий оценить уровень экспрессии мРНК, а также широкого спектра некодирующих РНК. В качестве биоматериала могут использоваться образцы крови [16, 17] и биоптаты легочных артерий, полученные в ходе ЛЭЭ [18, 19]. Gu Song с соавт. [20] с помощью микрочипового анализа выявили значительные изменения экспрессии генов *JAK3*, *GNA15*, *MAPK13* и *ARRB2* в эндотелиальных клетках легочной артерии. Эти гены участвуют в патологических процессах: *JAK3* регулирует пролиферацию и выживаемость гладкомышечных клеток при ремоделировании сосудов [21], а *ARRB2* (β -аррестин-2) модулирует сосудистый тонус, воздействуя на G-белок-сопряженные рецепторы [22]. Wenqing Xu с соавт. [23], анализируя методом РНК-секвенирования образцы цельной крови пациентов с ХТЭЛГ, установили, что уровень экспрессии генов *LINC00472*, *PIK3R6*, *SCN3A*

и *TCL6* может служить потенциальным маркером ранней диагностики заболевания. Применение технологии секвенирования РНК одиночных клеток позволило идентифицировать новые фармакологические мишени, такие как рецептор, активируемый протеазой-1 (PAR-1), ингибирование которого подавляет пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток, и тромбин-активированных миофибробластов [24].

Для углубленного изучения патогенеза и разработки новых методов лечения ХТЭЛГ были созданы экспериментальные модели на грызунах [25]. Однако выраженная фибринолитическая активность у крыс препятствует длительному сохранению аутологических тромбов в легочных артериях [26]. Ранее нами была разработана модель ХТЭЛГ, основанная на многократном внутривенном введении частично биodeградируемых альгинатных микрочастиц, что приводило к стойкой окклюзии сосудов, повышению давления в правом желудочке, ремоделированию ветвей легочной артерии и снижению толерантности к физической нагрузке [27, 28]. На второй неделе после последней инъекции микрочастиц отмечался пик концентрации С-реактивного белка, тогда как функциональные параметры оставались сопоставимыми со здоровыми животными, что указывает на постепенное формирование ХТЭЛГ. К шестой неделе наблюдалось достоверное увеличение диаметра легочного ствола и соотношения площадей полостей правого и левого желудочков. При этом с 6-й по 18-ю неделю динамика изменений диаметра легочного ствола отсутствовала, что свидетельствует о стабилизации патологического состояния.

Ранее мы идентифицировали 524 дифференциально экспрессирующихся гена (ДЭГ) в ткани легких крыс с ХТЭЛГ. Установлены изменения в биологических процессах, связанных с внеклеточным матриксом, межклеточными контактами, формированием эндотелиального слоя и цитоскелетом. Обнаруженные изменения в двигательных ресничках были подтверждены гистологически [29].

В данной работе рассмотрены ДЭГ легочной ткани крыс с ХТЭЛГ через 2 и 6 недель после моделирования заболевания многократными инъекциями частично биodeградируемых альгинатных микросфер. Валидировано изменение экспрессии генов Кавеолин-1 (*Cav1*), Эндоглин (*Eng*), Фактор фон Виллебранда (*vWF*), Белок альфа-5 щелевого соединения (*Gja5*), Кгуерпель-подобный фактор 5 (*Klf5*) на большей выборке образцов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн исследования

Ранее мы индуцировали ХТЭЛГ у крыс стока Wistar массой тела 226 (203; 248) г путем восьмикратного внутривенного введения частично биodeградируемых альгинатных микросфер в течение четырех недель [28]. Всего в транскриптомное исследование было включено 14 крыс: четыре крысы были выведены из эксперимента через 2 недели (ХТЭЛГ 2 нед) и четыре крысы через 6 недель (ХТЭЛГ 6 нед) после последней инъекции микросфер, а также шесть здоровых крыс в качестве контрольной группы, которых выводили одновременно с группой ХТЭЛГ 6 нед. Также для валидации экспрессии генов были включены 7 крыс с ХТЭЛГ через 6 недель после окончания введения микросфер и 6 здоровых крыс. Посмертный забор ткани левого легкого проводили с последующим измельчением образцов, разделением на 3 аликвоты и мгновенной заморозкой в жидком азоте. Хранение осуществляли при -80°C до экстракции РНК.

Выделение РНК

Замороженные образцы легочной ткани гомогенизировали в реагенте для экстракции РНК (Evrogen, Россия, Москва) с использованием гомогенизатора TissueLyzer (QIAGEN, Нидерланды, Венло) в течение 5 мин при частоте 50 Гц. Разделение РНК,

ДНК и белков проводили хлороформом. Осаждение РНК выполняли изопропанолом с последующей двукратной отмывкой 70%-ным этанолом. Качество и концентрацию тотальной РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 3300 (Thermo Fisher Scientific, США, Уолтем) и методом электрофореза в агарозном геле.

Подготовка библиотек РНК

Секвенируемые библиотеки получали с использованием набора TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit (Illumina, США, Сан-Диего) согласно протоколу производителя. Количественный анализ библиотек проводили с применением набора Qubit dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, США, Карлсбад). Контроль качества выполняли с использованием набора Agilent High Sensitivity DNA на системе Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США, Санта-Клара). Мультиплексированные библиотеки секвенировали на системе Illumina NextSeq 2000 (100 циклов) в режиме single-read 1×50 bp с 8-нуклеотидным индексным баркодом.

Биоинформатический анализ

Анализ сырых последовательностей проводили с использованием конвейера nf-core/rnaseq [30]. Обработка включала тримминг парных ридов программой TrimGalore v0.6.7, удаление рибосомальных РНК с помощью SortMeRNA v4.3.4, выравнивание на геном крысы (*Rattus norvegicus*) посредством STAR v2.7.10a, удаление дубликатов с использованием Picard v2.25.0 MarkDuplicates и количественную оценку транскриптов с применением RSEM v1.3.3. Дифференциально экспрессирующиеся гены между группами ХТЭЛГ и контроля выявляли пакетом DESeq2 для R [31] с пороговыми значениями $\log_2$ -кратного изменения (LFC) ≥ 1 и $p \leq 0.05$. Поправку на множественное тестирование проводили методом Бенджамини–Хохберга с контролем FDR на уровне 0.1. Анализ обогащения транскрипционных факторов осуществляли с помощью платформы ShinyGO 0.77 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go77/>).

Оценка относительной экспрессии генов

Уровни экспрессии генов *vWF*, *Cav1*, *Gja5*, *Eng* и *Klf5* оценивали методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Обратную транскрипцию проводили с использованием случайного (dN)10-праймера (Evrogen, Россия, Москва) и набора MMLV RT (Evrogen, Россия, Москва). Амплификацию кДНК выполняли на системе QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems, США, Уолтем) со специфичными праймерами (табл. 1). Анализ данных проводили методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ с нормализацией к референсному гену *GAPDH*.

Таблица 1. Последовательность праймеров

Название праймера	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера
<i>vWF</i>	TGACGACTTCAAAGCCCCTG	ATCCGAAAGGATTCATCTTGCC
<i>Cav1</i>	GTTCTCTTAAATCACAGCCCAGG	AGTGTAGAGATGTCCCTCGGA
<i>Eng</i>	GTCCTGACCTGTCTGGCAAA	TTGCTAGGGGCACGTGTGT
<i>Klf5</i>	GGAGACGATCTGAAACACGC	TCTCCATTTACATCTTGTCTGGA
<i>Gja5</i>	GGAGGAAAGGAAGCAGAAGGCT	AGACCTTGCCGATGACCGTA
<i>GAPDH</i>	CGGTGTGAACGGATTGGC	TTGAGGTCAATGAAGGGGTCG

Статистический анализ

Анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения R 4.2.2. Для оценки статистически достоверной разницы между группами использовали Критерий Манна–Уитни. Данные представляли в виде медианы с указанием межквартильного интервала (25–75%).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Модель ХТЭЛГ

Развитие патологии ХТЭЛГ подтверждалось стабильным повышением систолического и среднего давления в правом желудочке, наличием обструкции сосудистого русла эмболическими частицами, снижением толерантности к физической нагрузке и утолщением сосудистой стенки ветвей легочной артерии по данным гистологического исследования. Индивидуальные гемодинамические показатели и результаты гистологического анализа легочной ткани для каждой исследуемой крысы представлены в табл. 2.

Таблица 2. Структурно-функциональные показатели исследуемых животных

Группа	Номер	СДПЖ (мм рт. ст.)	СВ (мл/мин)	СДПЖ / СВ	Индекс гипертрофии сосудистой стенки
Контроль	Контроль 1	20.6	25.5	0.8	57.2 (37.5; 77.9)
	Контроль 2	24.0	26.5	1.0	59.3 (41.9; 74.8)
	Контроль 3	26.9	28.2	0.9	44.5 (36.3; 54.8)
	Контроль 4	31.5	42.0	0.8	39.7 (31.1; 45.5)
	Контроль 5	28.4	31.7	0.9	44.3 (40.6; 53.8)
	Контроль 6	24.1	31.0	0.8	59.5 (68.4; 68.4)
ХТЭЛГ 2 нед	ХТЭЛГ 2 нед 1	40.5	39.7	1.02	74.8 (62.6; 85.2)
	ХТЭЛГ 2 нед 2	57.2	22.0	2.6	66.7 (56.2; 84.2)
	ХТЭЛГ 2 нед 3	32.8	20.0	1.64	68.8 (52.7; 81.9)
	ХТЭЛГ 2 нед 4	41.6	33.5	1.24	63.2 (51.8; 74.8)
ХТЭЛГ 6 нед	ХТЭЛГ 6 нед 1	39.0	18.4	2.12	68.8 (55.8; 86.1)
	ХТЭЛГ 6 нед 2	53.9	16.4	3.29	72.3 (61.1; 78.7)
	ХТЭЛГ 6 нед 3	31.7	38.3	0.83	81.2 (72.5; 87.9)
	ХТЭЛГ 6 нед 4	47.2	16.2	2.91	82.3 (75.9; 93.5)

СДПЖ – систолическое давление в правом желудочке; СВ – сердечный выброс.

Дифференциально экспрессируемые гены

Углубленный анализ ранее выявленных ДЭГ позволил установить, что среди общих генов, различающихся между экспериментальными группами и контрольной, к 6-й неделе наблюдалось уменьшение абсолютной величины LFC для некоторых генов, таких как *SNORD17*, *SCTR* и *MT3* (табл. 3). Только ген *SCTR* продемонстрировал различный профиль экспрессии во всех исследованных группах.

Таблица 3. Пять ДЭГ с наиболее повышенной и пониженной экспрессией в экспериментальных группах по сравнению с контрольной группой

Гены	ХТЭЛГ 2 нед.		ХТЭЛГ 6 нед.	
	LFC	<i>p</i> -значение	LFC	<i>p</i> -значение
Пониженная экспрессия				
<i>SNORD17</i>	–6.72	0.0008	–4.00	0.0303
<i>DLK1</i>	–3.90	0.0100	–3.79	0.0137
<i>RPPH1</i>	–3.61	0.0001	–3.42	0.0005
<i>AFF2</i>	–2.34	0.0069	–2.19	0.0102
<i>ACER2</i>	–1.99	0.0343	–2.61	0.0031
Повышенная экспрессия				
<i>SCTR</i>	4.79	0.0000	2.05	0.0067
<i>MT3</i>	4.03	0.0000	2.73	0.0128
<i>TMEM171</i>	2.10	0.0000	1.76	0.0025
<i>PRSS22</i>	1.49	0.0406	1.75	0.0113
<i>EPHB2</i>	1.47	0.0158	1.45	0.0180

Анализ ДЭГ выявил кластеризацию по функциональным группам в зависимости от кодируемых белков. В частности, были идентифицированы гены, продукты которых ассоциированы с внеклеточным матриксом (рис. 1a) и воспалением (рис. 1b).

Для генов, кодирующих компоненты внеклеточного матрикса, характерно снижение экспрессии коллагенов, *Mmp8* и *Adamts2* на 6-й неделе эксперимента при отсутствии различий между здоровыми животными и группой ХТЭЛГ 2 нед. При этом в группе ХТЭЛГ 2 нед наблюдается повышенная экспрессия большинства металлопротеиназ, *Colla1*, *Col9a2* и *Timp1*.

В группе генов воспалительного ответа выявлены следующие закономерности: хемокины *Ccl2*, *Ccl21* и большинство лектинов С-типа демонстрируют повышенную экспрессию на 2-й неделе с последующей нормализацией до контрольного уровня к 6-й неделе. В то же время гены *Ccl5*, *Ccl4*, *Cxcl12*, *Cxcl17*, Toll-подобные рецепторы и белки семейства S100 характеризуются прогрессирующим снижением экспрессии к 6-й неделе после введения альгинатных микросфер. Обнаруженные изменения экспрессионных профилей отражают патогенетические механизмы формирования и прогрессирования ХТЭЛГ, что подтверждает валидность использованной экспериментальной модели заболевания.

Анализ обогащения транскрипционных факторов

Для выявления транскрипционных факторов (ТФ), потенциально участвующих в регуляции идентифицированных ДЭГ, был применен метод обогащения мотивов связывания в промоторных регионах. В результате анализа обнаружено 47 ТФ, предположительно вовлеченных в формирование экспериментальной модели ХТЭЛГ. Среди них преобладали белки с C2H2 цинк-пальцевыми доменами, а также выявлены представители семейств AP-2, CxxC, E2F, ядерных рецепторов и MBD-белков. Тринадцать ТФ были общими для всех групп ДЭГ. Примечательно, что *Zfp278* и *Klf5* вошли в топ-10 наиболее значимых транскрипционных факторов (табл. 4).

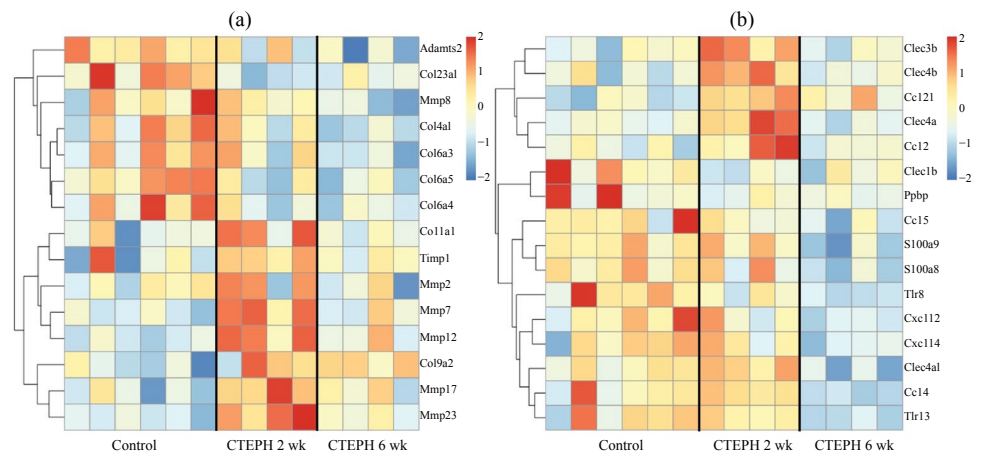


Рис. 1. Тепловая карта дифференциально экспрессирующихся генов, ассоциированных с внеклеточным матриксом (а) и воспалением (б). ГрадIENTная цветовая шкала иллюстрирует степень дифференциальной экспрессии генов: синий цвет обозначает снижение экспрессии, красный – повышение.

Таблица 4. Топ-10 транскрипционных факторов, определенных по ДЭГ

ХТЭЛГ 2 нед VS Контроль			ХТЭЛГ 6 нед VS Контроль			ХТЭЛГ 6 нед VS ХТЭЛГ 2 нед		
ТФ	ТФ семейство	р-знач	ТФ	ТФ семейство	р-знач	ТФ	ТФ семейство	р-знач
Zfp278	C2H2 ZF	3.60E-05	Zic4	C2H2 ZF	1.18E-13	Zfp278	C2H2 ZF	3.05E-05
Zfp281	C2H2 ZF	7.96E-05	Plag1	C2H2 ZF	1.77E-13	Zfp202	C2H2 ZF	3.05E-05
Sp2	C2H2 ZF	7.96E-05	Zfp278	C2H2 ZF	2.75E-13	D4A538 RAT	C2H2 ZF	3.74E-05
Klf5	C2H2 ZF	7.96E-05	Cxxc1	CxxC	7.06E-13	Zfp281	C2H2 ZF	4.29E-05
Zic2	C2H2 ZF	8.73E-05	Plag1l	C2H2 ZF	2.28E-12	Plag1l	C2H2 ZF	7.93E-05
Zfp202	C2H2 ZF	8.78E-05	Sp2	C2H2 ZF	2.80E-12	Plag1	C2H2 ZF	1.22E-04
Klf4	C2H2 ZF	2.04E-04	Klf5	C2H2 ZF	2.09E-11	Glis2	C2H2 ZF	1.72E-04
Zbtb7b	C2H2 ZF	2.04E-04	Tcfap2c	AP-2	2.51E-11	Zic5	C2H2 ZF	1.72E-04
D4A538 RAT	C2H2 ZF	2.06E-04	Klf7	C2H2 ZF	4.02E-11	Klf5	C2H2 ZF	5.23E-04
Zic3	C2H2 ZF	2.06E-04	D3ZGU0 RAT	C2H2 ZF	8.57E-11	Mzf1	C2H2 ZF	1.96E-03

Валидация экспрессии генов

Анализ нормированного количества транскриптов генов *Eng*, *vWF*, *Cav1*, *Gja5*, *Klf5* позволил установить различия между группой контроля и ХТЭЛГ 6 нед для всех генов, кроме *Klf5* (рис. 2). При этом экспрессия *Eng*, *vWF* и *Gja5* в группе ХТЭЛГ 2 нед не отличается от нативных крыс, в отличие от *Cav1*, экспрессия которого снижается уже на 2-й неделе. Это делает *Cav1* ранним индикатором патологических процессов при ХТЭЛГ, а сохранение на одном уровне экспрессии во времени указывает на стабильность *Cav1* в качестве маркера транскрипционных изменений при ХТЭЛГ.

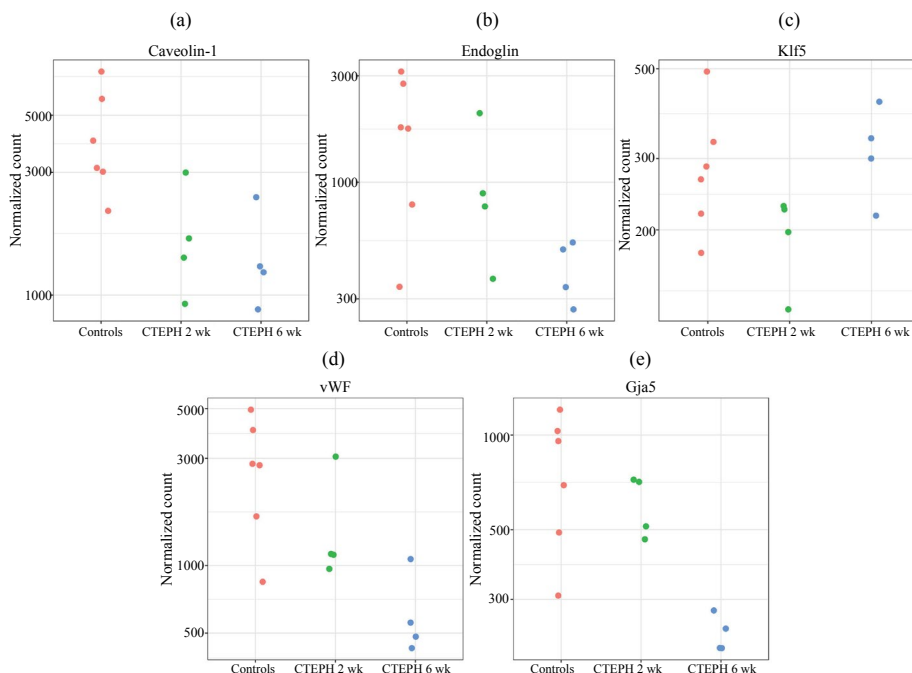


Рис. 2. Динамика изменения экспрессии генов в экспериментальных группах в сравнении с контрольной по результатам РНК-секвенирования.

ОТ-ПЦР в реальном времени использовался для оценки экспрессии генов в образцах легочной ткани: *Eng*, *vWF*, *Cav1*, *Gja5*, *Klf5*. В данном исследовании было использовано 11 животных, подвергшихся экспериментальному воздействию: из них 7 крыс были взяты из новой когорты, а еще 4 особи были отобраны из группы, по которой ранее проводился транскриптомный анализ. Контрольная группа включала 9 крыс: 6 из новой когорты и 3 из группы, для которой также проводился анализ транскриптома. Сравнительный анализ выявил снижение экспрессии *Eng*, *vWF*, *Cav1* и *Gja5* в экспериментальной группе по сравнению со здоровыми животными, что согласуется с транскриптомным анализом данных (рис. 3). Экспрессия *Klf5* не показала значительных изменений в группе ХТЭЛГ 6 нед.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на прогресс в хирургическом и фармакологическом лечении, ХТЭЛГ по-прежнему существенно влияет на показатели выживаемости пациентов. Десятилетняя выживаемость при использовании современных методов терапии составляет 58.6%, тогда как среди неоперабельных пациентов, получающих только ЛАГ-специфическую терапию, этот показатель не превышает 41.7% [32]. Разработка новых фармакологических препаратов затруднена недостаточным пониманием патогенеза ХТЭЛГ, что подчеркивает важность фундаментальных исследований в этой области.

Модификации внеклеточного матрикса представляют собой характерную особенность процесса ремоделирования при ХТЭЛГ. В нашем исследовании выявлены изменения экспрессии генов, кодирующих коллаген различного типа: в группе ХТЭЛГ 6 нед наблюдалось снижение экспрессии *Col4a1*, *Col6a3*, *Col6a4*, *Col6a5*, тогда как в группе

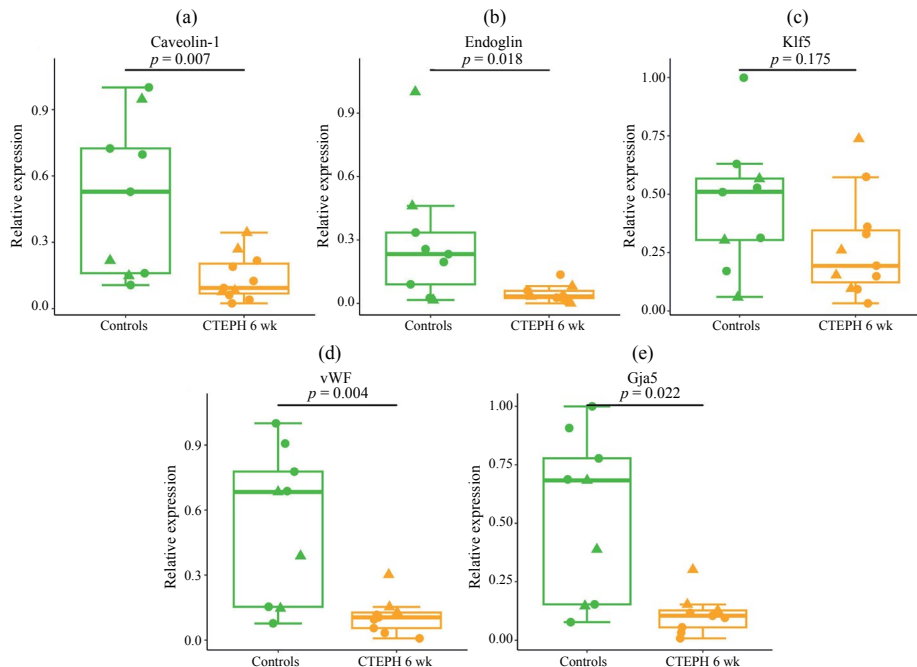


Рис. 3. Валидация ОТ-ПЦР-уровней экспрессии *Cav1* (a), *Eng* (b), *Klf5* (c), *vWF* (d), *Gja5* (e) в образцах тканей легких. Круг обозначает образец легких крыс из новой когорты ХТЭЛГ 6 нед или здоровых животных, а треугольник – образец, использованный в исследовании транскриптома.

ХТЭЛГ 2 нед отмечалось снижение *Col23a1* и повышение *Colla1*, *Col9a2*. Следует отметить, что в модели ЛАГ, индуцированной монокроталином у крыс, наблюдается повышенная экспрессия различных типов коллагенов в ткани легких [33], что показывает схожесть процессов ремоделирования при ЛГ разной этиологии. Параллельно обнаружено увеличение экспрессии металлопротеиназ *Mmp23*, *Mmp12*, *Mmp7*, *Adamts2* в группе ХТЭЛГ 2 нед и снижение *MMP8*, *MMP17* к 6-й неделе, что свидетельствует о прекращении активного ремоделирования в легких крыс к этому сроку.

Воспалительные процессы, как показано в исследованиях на животных моделях и у человека [12, 34], играют ключевую роль в формировании ХТЭЛГ. Формирование тромба сопровождается активным участием клеток иммунной системы – таких как макрофаги, нейтрофилы и Т-лимфоциты [35], а также изменениями в уровне различных воспалительных медиаторов в крови у больных ХТЭЛГ [36–38]. В ходе нашего анализа было установлено, что на 2-й неделе после индукции ХТЭЛГ увеличивается экспрессия хемокинов *Ccl2* и *Ccl21*, в то время как к 6-й неделе наблюдается снижение экспрессии *Cxcl12*, *Cxcl17*, *Ccl5* и *Ccl4*. Эти результаты свидетельствуют о том, что асептическое воспаление наиболее выражено на раннем этапе заболевания [39, 40], а затем постепенно уменьшается по мере прогрессирования патологического процесса [41, 42]. Помимо этого, были выявлены изменения в системе врожденного иммунитета, в частности, в группе ХТЭЛГ 6 нед снижалась экспрессия генов *TLR8* и *TLR13*. Также выявлены изменения экспрессии С-лектинов, распознающих как экзогенные, так и эндогенные антигены и инициирующих воспаление [43], включая *Clec1b*, участвующий в агрегации тромбоцитов, и *Clec3b*, усиливающий активацию плазминогена [44]. На 2-й неделе наблюдалось снижение экспрессии *Clec1b* и повышение *Clec3b*, *Clec4a*, *Clec4e*, тогда как к 6-й неделе отмечалось только снижение *Clec4a1*. Это согласуется

с данными по модели ЛАГ, индуцированной монокроталином, где изменения экспрессии генов, связанных с воспалением и иммунитетом, также преимущественно происходят на ранних стадиях формирования ЛАГ [45, 46].

ТФ, идентифицированные по мотивам связывания в промоторах ДЭГ, преимущественно принадлежат к семейству Cys2-His2 цинк-пальцевых белков, являющемуся наиболее многочисленным семейством транскрипционных факторов. Два фактора входили в топ-10 для всех групп ДЭГ. Zfp278 подавляет функции Т-лимфоцитов и участвует в р53-опосредованном контроле клеточного цикла [47]. Было показано, что Zfp278 участвует в патогенезе гипоксией-индуцированной ЛГ [48]. Klf5 играет важную роль в гипоксией-индуцированном сосудистом ремоделировании через сигнальный путь HIF-1 α [49]. Примечательно, что промоторы генов *Eng* и *Cav1*, помимо их установленной ассоциации с ХТЭЛГ, содержат GC-богатые последовательности, распознаваемые Klf5 [50, 51]. Однако значимых различий в экспрессии *Klf5* в образцах легочной ткани между группой ХТЭЛГ 6 нед и здоровыми животными при анализе методом ПЦР в реальном времени выявлено не было. Поскольку активность ТФ нередко определяется их фосфорилированием [52], для оценки потенциальной роли Klf5 в патогенезе ХТЭЛГ требуются дальнейшие эксперименты *in vitro*.

Гены для валидации методом ПЦР были отобраны на основе нормированного количества ридов и их известной из литературы ассоциации с развитием ЛГ, в частности ХТЭЛГ.

Белок Cav1 играет критическую роль в формировании и поддержании структурной целостности кавеол. Экспериментально доказано, что дефицит Cav1 приводит к нарушению кальциевого гомеостаза и последующему снижению синтеза вазодилатирующих факторов [53]. В данной работе выявлено снижение экспрессии *Cav1* в группах ХТЭЛГ 2 нед и ХТЭЛГ 6 нед как при транскриптомном анализе, так и при валидации методом ОТ-ПЦР. Эти изменения могут способствовать процессам сосудистого ремоделирования. Клиническая значимость Cav1 подтверждается обнаружением мутаций в соответствующем гене у пациентов с ХТЭЛГ [54] и регистрацией повышенных концентраций кальция в эндотелиальных клетках [55], что подчеркивает важную роль данного белка в формировании ЛГ.

vWF, являясь ключевым медиатором активации тромбоцитов, демонстрирует противоречивую динамику экспрессии при ХТЭЛГ. Исследования *in vitro* показали повышенное содержание vWF в тельцах Вайбеля–Паладе эндотелиальных клеток проксимальных легочных артерий пациентов с ХТЭЛГ по сравнению как с донорским материалом, так и с образцами пациентов с неэмболической ЛГ [56]. Более того, при ко-культивировании с тромбоцитами эндотелиоциты пациентов с ХТЭЛГ экспрессируют пятикратно увеличенное количество vWF [57]. Однако иммуногистохимический анализ образцов, полученных при тромбэндартерэктомии, выявил сниженное содержание vWF в легочных артериях пациентов с ХТЭЛГ по сравнению с контролем, причем на уровне, сопоставимом с таковым у пациентов с ЛАГ [58]. Эти данные согласуются с результатами протеомного анализа эндотелиоцитов пациентов с ХТЭЛГ, где также обнаружено уменьшение количества vWF [59]. В нашем эксперименте зарегистрировано значимое снижение экспрессии *vWF* в группе ХТЭЛГ 6 нед при отсутствии изменений на 2-й неделе. Вероятно, наблюдаемая динамика отражает метаболическую перестройку эндотелиоцитов в процессе сосудистого ремоделирования, тогда как точная роль vWF в патогенезе ХТЭЛГ у человека требует дальнейшего изучения.

Ген *Gja5*, кодирующий белок коннексин 40, играет важную роль в развитии ЛГ, так как контролирует процессы межклеточного взаимодействия и перестройки сосудистой стенки. При длительном недостатке кислорода наблюдается снижение экспрессии *Gja5* в эндотелиальных клетках, выделенных из легочных артерий, что приводит к нарушению эндотелий-зависимой гиперполяризации. В результате возникает

вазоконстрикция и увеличение давления в легочной артерии [60]. В группе ХТЭЛГ 6 нед также зафиксировано снижение экспрессии *Gja5*.

Eng относится к мембранным белкам, которые преимущественно присутствуют на поверхности делящихся эндотелиальных клеток. Этот рецептор играет важную роль в процессах формирования новых сосудов и участвует в реакциях клеток на гипоксию [61]. Исследования, проводимые на клиническом материале, показали, что у больных ХТЭЛГ количество белка Eng в эндотелии сосудов увеличено [59]. Однако в рамках нашего эксперимента в группе ХТЭЛГ 6 нед было выявлено, что уровень экспрессии соответствующего гена, напротив, снизился. Такие результаты были подтверждены как анализом транскриптома, так и дополнительной проверкой с помощью количественной ОТ-ПЦР. Это расхождение может указывать на определенные ограничения используемой экспериментальной модели в полной мере воспроизводить молекулярные механизмы заболевания у человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования демонстрируют, что многократная эмболизация ветвей легочной артерии крыс частично биodeградируемыми микросферами из альгината натрия индуцирует молекулярные изменения в тканях легких, ассоциированные с изменением уровня экспрессии генов, участвующих в ремоделировании внеклеточного матрикса, воспалительных процессах и эндотелиальной дисфункции. На ранней стадии наблюдается повышение экспрессии генов, кодирующих коллагены, металлопротеиназы и хемокины, при одновременном снижении уровня С-лектинов, что свидетельствует о фазе активного воспаления и ремоделирования тканей; тогда как на поздней стадии наблюдается снижение экспрессии генов, ответственных за синтез коллагенов, металлопротеиназ и хемокинов, что указывает на затухание процессов ремоделирования. Учитывая, что при развитии ХТЭЛГ у крыс динамика изменения экспрессии генов *Cav1*, *vWF* и *Gja5* согласуется с клиническими и экспериментальными данными, разработанная модель ХТЭЛГ на крысах воспроизводит ряд изменений транскрипционного профиля, характерных для патогенеза ХТЭЛГ у человека, и может быть использована для изучения новых терапевтических подходов для лечения ХТЭЛГ.

Таким образом, разработанная модель ХТЭЛГ на крысах воспроизводит характерные для человека изменения транскрипционного профиля, отражая тем самым высокую степень сопоставимости между моделью и человеческой патологией. Выявлен перечень генов, которые могут быть использованы для подтверждения формирования ХТЭЛГ у крыс. *Cav1* является предпочтительным, поскольку изменение его экспрессии происходит на ранних этапах и сохраняется во времени.

ВКЛАД АВТОРОВ

Разработка концепции и дизайна статьи (В. Н. С., К. А. А., К. О. В., К. А. А.), работа с животными (Ш. Л. А., И. Д. Ю.), генетические исследования (В. Н. С.), написание и редактирование манускрипта (В. Н. С., К. О. В., К. А. А., К. А. А., Г. М. М.)

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-75-10122, <https://rscf.ru/project/23-75-10122/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биоэтике Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Минздрава России 14.05.2019 г., протокол № #Rats-04/1–19.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Avdeev SN, Barbarash OL, Valieva ZS, Volkov AV, Veselova TN, Galyavich AS, Goncharova NS, Gorbachevsky SV, Gramovich VV, Danilov NM, Klimenko AA, Martynyuk TV, Moiseeva OM, Ryzhkova DV, Simakova MA, Sinityn VE, Stukalova OV, Chazova IE, Chernogrivov IE, Shmalts AA, Tsareva NA (2024) Clinical practice guidelines for Pulmonary hypertension, including chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Russ J Cardiol* 29: 6161. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2024-6161>
2. Otani N, Watanabe R, Tomoe T, Toyoda S, Yasu T, Nakamoto T (2023) Pathophysiology and Treatment of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Int J Mol Sci* 24: 3979. <https://doi.org/10.3390/ijms24043979>
3. Kim NH, Delcroix M, Jais X, Madani MM, Matsubara H, Mayer E, Ogo T, Tapson VF, Ghofrani H-A, Jenkins DP (2019) Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 53: 1801915. <https://doi.org/10.1183/13993003.01915-2018>
4. Coquoz N, Weilenmann D, Stolz D, Popov V, Azzola A, Fellrath J-M, Stricker H, Pagnamenta A, Ott S, Ulrich S, Györik S, Pasquier J, Aubert J-D (2018) Multicentre observational screening survey for the detection of CTEPH following pulmonary embolism. *Eur Respir J* 51: 1702505. <https://doi.org/10.1183/13993003.02505-2017>
5. Ogawa A, Satoh T, Fukuda T, Sugimura K, Fukumoto Y, Emoto N, Yamada N, Yao A, Ando M, Ogino H, Tanabe N, Tsujino I, Hanaoka M, Minatoya K, Ito H, Matsubara H (2017) Balloon Pulmonary Angioplasty for Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: Results of a Multicenter Registry. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 10: e004029. <https://doi.org/10.1161/CIRCOUTCOMES.117.004029>
6. Klok FA, Couturaud F, Delcroix M, Humbert M (2020) Diagnosis of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after acute pulmonary embolism. *Eur Respir J* 55: 2000189. <https://doi.org/10.1183/13993003.00189-2020>
7. Bonderman D, Jakowitsch J, Adlbrecht C, Schemper M, Kyrle P, Schönauer V, Exner M, Klepetko W, Kneussl M, Maurer G, Lang I (2005) Medical conditions increasing the risk of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Thromb Haemost* 93: 512–516. <https://doi.org/10.1160/TH04-10-0657>
8. Pengo V, Lensing AWA, Prins MH, Marchiori A, Davidson BL, Tiozzo F, Albanese P, Biasiolo A, Pegoraro C, Iliceto S, Prandoni P (2004) Incidence of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension after Pulmonary Embolism. *N Engl J Med* 350: 2257–2264. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032274>
9. Simonneau G, Dorfmueller P, Guignabert C, Mercier O, Humbert M (2022) Chronic thromboembolic pulmonary hypertension: the magic of pathophysiology. *Ann Cardiothorac Surg* 11: 106–119. <https://doi.org/10.21037/acs-2021-pte-10>
10. Vrigkou E, Tsantes A, Konstantonis D, Rapti E, Maratou E, Pappas A, Halvatsiotis P, Tsangaris I (2022) Platelet, Fibrinolytic and Other Coagulation Abnormalities in Newly-Diagnosed Patients with Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Diagnostics* 12: 1238. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12051238>
11. Moser KM, Bioor CM (1993) Pulmonary Vascular Lesions Occurring in Patients with Chronic Major Vessel Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Chest* 103: 685–692. <https://doi.org/10.1378/chest.103.3.685>

12. *Simonneau G, Torbicki A, Dorfmüller P, Kim N* (2017) The pathophysiology of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir Rev* 26: 160112.
<https://doi.org/10.1183/16000617.0112-2016>
13. *Rahaghi FN, Ross JC, Agarwal M, González G, Come CE, Diaz AA, Vegas-Sánchez-Ferrero G, Hunsaker A, Estépar RSJ, Waxman AB, Washko GR* (2016) Pulmonary Vascular Morphology as an Imaging Biomarker in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Pulm Circ* 6: 70–81.
<https://doi.org/10.1086/685081>
14. *Oliveira T, Kato-Morinaga L, Assad A, Oliveira E, Jardim C, Alves-Jr J, Souza R, Fernandes CJC* (2019) Platelets and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. In: *Pulmonary hypertension*. Eur Respiratory Society. PA1444.
15. *Perino MG, Moldobaeva A, Jenkins J, Wagner EM* (2013) Chemokine Localization in Bronchial Angiogenesis. *PLoS One* 8: e66432.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066432>
16. *Miao R, Wang Y, Wan J, Leng D, Gong J, Li J, Liang Y, Zhai Z, Yang Y* (2017) Microarray expression profile of circular RNAs in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Medicine (Baltimore)* 96: e7354.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000007354>
17. *Guo L, Yang Y, Liu J, Wang L, Li J, Wang Y, Liu Y, Gu S, Gan H, Cai J, Yuan JX-J, Wang J, Wang C* (2014) Differentially Expressed Plasma MicroRNAs and the Potential Regulatory Function of Let-7b in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *PLoS One* 9: e101055.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101055>
18. *Miao R, Dong X, Gong J, Li Y, Guo X, Wang J, Huang Q, Wang Y, Li J, Yang S, Kuang T, Liu M, Wan J, Zhai Z, Zhong J, Yang Y* (2022) Single-cell RNA-sequencing and microarray analyses to explore the pathological mechanisms of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Front Cardiovasc Med* 9: 900353.
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.900353>
19. *Gu S, Li G, Zhang X, Yan J, Gao J, An X, Liu Y, Su P* (2015) Aberrant expression of long noncoding RNAs in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Mol Med Rep* 11: 2631–2643.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2014.3102>
20. *Gu S, Su P, Yan J, Zhang X, An X, Gao J, Xin R, Liu Y* (2014) Comparison of gene expression profiles and related pathways in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Int J Mol Med* 33: 277–300.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1582>
21. *Wang Y-C, Cui X-B, Chuang Y-H, Chen S-Y* (2017) Janus Kinase 3, a Novel Regulator for Smooth Muscle Proliferation and Vascular Remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 37: 1352–1360.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308895>
22. *Lee C, Viswanathan G, Choi I, Jassal C, Kohlmann T, Rajagopal S* (2020) Beta-Arrestins and Receptor Signaling in the Vascular Endothelium. *Biomolecules* 11: 9.
<https://doi.org/10.3390/biom11010009>
23. *Xu W, Deng M, Meng X, Sun X, Tao X, Wang D, Zhang S, Zhen Y, Liu X, Liu M* (2022) The alterations in molecular markers and signaling pathways in chronic thromboembolic pulmonary hypertension, a study with transcriptome sequencing and bioinformatic analysis. *Front Cardiovasc Med* 9: 961305.
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.961305>
24. *Viswanathan G, Kirshner HF, Nazo N, Ali S, Ganapathi A, Cumming I, Zhuang Y, Choi I, Warman A, Jassal C, Almeida-Peters S, Haney J, Corcoran D, Yu Y-R, Rajagopal S* (2023) Single-Cell Analysis Reveals Distinct Immune and Smooth Muscle Cell Populations that Contribute to Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 207: 1358–1375.
<https://doi.org/10.1164/rccm.202203-0441OC>
25. *Karpov AA, Vaulina DD, Smirnov SS, Moiseeva OM, Galagudza MM* (2022) Rodent models of pulmonary embolism and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Heliyon* 8: e09014.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09014>
26. *Mercier O, Fadel E* (2013) Chronic thromboembolic pulmonary hypertension: animal models. *Eur Respir J* 41: 1200–1206.
<https://doi.org/10.1183/09031936.00101612>

27. Karpov AA, Vachrushev NS, Shilenko LA, Smirnov SS, Bunenkov NS, Butskih MG, Chervaev A-KA, Vaulina DD, Ivkin DYU, Moiseeva OM, Galagudza MM (2023) 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* 10: 40.
<https://doi.org/10.3390/jcdd10020040>
28. Karpov AA, Anikin NA, Mihailova AM, Smirnov SS, Vaulina DD, Shilenko LA, Ivkin DYU, Bagrov AY, Moiseeva OM, Galagudza MM (2021) Model of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension in Rats Caused by Repeated Intravenous Administration of Partially Biodegradable Sodium Alginate Microspheres. *Int J Mol Sci* 22: 1149.
<https://doi.org/10.3390/ijms22031149>
29. Vachrushev N S, Karpov AA, Shilenko LA, Vaulina DD, Kalinina OV, Kostareva AA, Galagudza MM (2025) Lung tissue RNA sequencing shows dysregulation of the bronchial epithelium in a rat model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Bull Exp Biol Med* 179: 668–771.
<https://doi.org/10.47056/0365-9615-2025-179-6-668-671>
30. Ewels PA, Peltzer A, Fillinger S, Patel H, Alneberg J, Wilm A, Garcia MU, Di Tommaso P, Nahnsen S (2020) The nf-core framework for community-curated bioinformatics pipelines. *Nat Biotechnol* 38: 276–278.
<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0439-x>
31. Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15: 550.
<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
32. Kūçükoğlu MS (2019) Ten Year Outcome of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension Patients in a Tertiary University Hospital. *Anatol J Cardiol* 23(2): 105–109.
<https://doi.org/10.14744/AnatolJCardiol.2019.90329>
33. Xiao G, Zhuang W, Wang T, Lian G, Luo L, Ye C, Wang H, Xie L (2020) Transcriptomic analysis identifies Toll-like and Nod-like pathways and necroptosis in pulmonary arterial hypertension. *J Cell Mol Med* 24: 11409–11421.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.15745>
34. Wu D, Chen Y, Wang W, Li H, Yang M, Ding H, Lv X, Lian N, Zhao J, Deng C (2020) The role of inflammation in a rat model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension induced by carageenan. *Ann Transl Med* 8: 492–492.
<https://doi.org/10.21037/atm.2020.02.86>
35. Quarck R, Wynants M, Verbeken E, Meyns B, Delcroix M (2015) Contribution of inflammation and impaired angiogenesis to the pathobiology of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 46: 431–443.
<https://doi.org/10.1183/09031936.00009914>
36. Yang M, Deng C, Wu D, Zhong Z, Lv X, Huang Z, Lian N, Liu K, Zhang Q (2016) The role of mononuclear cell tissue factor and inflammatory cytokines in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *J Thromb Thrombolys* 42: 38–45.
<https://doi.org/10.1007/s11239-015-1323-2>
37. Cisowska-Czajka ME, Mazij MP, Kotschy MH, Lewczuk J (2016) Plasma concentrations of tissue factor and its inhibitor in chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a step closer to explanation of the disease aetiology? *Kardiologia* 74: 1332–1338.
<https://doi.org/10.5603/KP.a2016.0088>
38. Kimura H, Okada O, Tanabe N, Tanaka Y, Terai M, Takiguchi Y, Masuda M, Nakajima N, Hiroshima K, Inadera H, Matsushima K, Kuriyama T (2001) Plasma Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Pulmonary Vascular Resistance in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 319–324.
<https://doi.org/10.1164/ajrcrm.164.2.2006154>
39. Hoffmann-Vold A, Hesselstrand R, Fretheim H, Ueland T, Andreassen AK, Brunborg C, Palchevskiy V, Midtvedt Ø, Garen T, Aukrust P, Belperio JA, Molberg Ø (2018) CCL21 as a Potential Serum Biomarker for Pulmonary Arterial Hypertension in Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheumatol* 70: 1644–1653.
<https://doi.org/10.1002/art.40534>

40. Amsellem V, Abid S, Poupel L, Parpaleix A, Rodero M, Gary-Bobo G, Latiri M, Dubois-Randé J-L, Lipskaia L, Combadiere C, Adnot S (2017) Roles for the CX3CL1/CX3CR1 and CCL2/CCR2 Chemokine Systems in Hypoxic Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 56: 597–608.
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0201OC>
41. Nie X, Tan J, Dai Y, Liu Y, Zou J, Sun J, Ye S, Shen C, Fan L, Chen J, Bian J-S (2018) CCL5 deficiency rescues pulmonary vascular dysfunction, and reverses pulmonary hypertension via caveolin-1-dependent BMPR2 activation. *J Mol Cell Cardiol* 116: 41–56.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.01.016>
42. Bordenave J, Thuillet R, Tu L, Phan C, Cumont A, Marsol C, Huertas A, Savale L, Hibert M, Galzi J-L, Bonnet D, Humbert M, Frossard N, Guignabert C (2020) Neutralization of CXCL12 attenuates established pulmonary hypertension in rats. *Cardiovasc Res* 116: 686–697.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvz153>
43. Drouin M, Saenz J, Chiffolleau E (2020) C-Type Lectin-Like Receptors: Head or Tail in Cell Death Immunity. *Front Immunol* 11: 251.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00251>
44. Brown GD, Willment JA, Whitehead L (2018) C-type lectins in immunity and homeostasis. *Nat Rev Immunol* 18: 374–389.
<https://doi.org/10.1038/s41577-018-0004-8>
45. Chen Y, Wu C, Wang X, Zhou X, Kang K, Cao Z, Yang Y, Zhong Y, Xiao G (2022) Weighted gene co-expression network analysis identifies dysregulated B-cell receptor signaling pathway and novel genes in pulmonary arterial hypertension. *Front Cardiovasc Med* 9: 909399.
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.909399>
46. Xiao G, Wang T, Zhuang W, Ye C, Luo L, Wang H, Lian G, Xie L (2020) RNA sequencing analysis of monocrotaline-induced PAH reveals dysregulated chemokine and neuroactive ligand receptor pathways. *Aging* 12: 4953–4969.
<https://doi.org/10.18632/aging.102922>
47. Keskin N, Deniz E, Eryilmaz J, Un M, Batur T, Ersahin T, Cetin Atalay R, Sakaguchi S, Ellmeier W, Erman B (2015) PATZ1 Is a DNA Damage-Responsive Transcription Factor That Inhibits p53 Function. *Mol Cell Biol* 35: 1741–1753.
<https://doi.org/10.1128/MCB.01475-14>
48. Wakasugi T, Shimizu I, Yoshida Y, Hayashi Y, Ikegami R, Suda M, Katsuumi G, Nakao M, Hoyano M, Kashimura T, Nakamura K, Ito H, Nojiri T, Soga T, Minamino T (2019) Role of smooth muscle cell p53 in pulmonary arterial hypertension. *PLOS One* 14: e0212889.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212889>
49. Li X, He Y, Xu Y, Huang X, Liu J, Xie M, Liu X (2016) KLF5 mediates vascular remodeling via HIF-1 α in hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 310: L299–L310.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00189.2015>
50. Xie L, Xue X, Taylor M, Ramakrishnan SK, Nagaoka K, Hao C, Gonzalez FJ, Shah YM (2014) Hypoxia-Inducible Factor/MAZ-Dependent Induction of Caveolin-1 Regulates Shon Permeability through Suppression of Occludin, Leading to Hypoxia-Induced Inflammation. *Mol Cell Biol* 34: 3013–3023.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00324-14>
51. Sánchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernabéu C (2002) Endoglin Expression Is Regulated by Transcriptional Cooperation between the Hypoxia and Transforming Growth Factor- β Pathways. *J Biol Chem* 277: 43799–43808.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M207160200>
52. Whitmarsh AJ, Davis RJ (2000) Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cell Mol Life Sci CMLS* 57: 1172–1183.
<https://doi.org/10.1007/pl00000757>
53. Chettimada S (2015) Caveolae, caveolin-1 and cavin-1: Emerging roles in pulmonary hypertension. *World J Respirol* 5: 126.
<https://doi.org/10.5320/wjr.v5.i2.126>
54. Opitz I, Kirschner M (2019) Molecular Research in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Int J Mol Sci* 20: 784.
<https://doi.org/10.3390/ijms20030784>

55. Zabini D, Nagaraj C, Stacher E, Lang IM, Nierlich P, Klepetko W, Heinemann A, Olschewski H, Bálint Z, Olschewski A (2012) Angiostatic Factors in the Pulmonary Endarterectomy Material from Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension Patients Cause Endothelial Dysfunction. *PLoS One* 7: e43793.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043793>
56. Quarcq R, Wynants M, Ronisz A, Sepulveda MR, Wuytack F, Van Raemdonck D, Meyns B, Delcroix M (2012) Characterization of proximal pulmonary arterial cells from chronic thromboembolic pulmonary hypertension patients. *Respir Res* 13: 27.
<https://doi.org/10.1186/1465-9921-13-27>
57. Manz XD, Pan X, Symersky P, Majolée J, Hordijk P, Voorberg J, Aman J, Bogaard HJ, Szulcek R (2020) Elevated Von Willebrand Factor expression in the activated pulmonary endothelium of chronic thromboembolic pulmonary hypertension patients enhances platelet adhesion. In: *Pulmonary hypertension*. European Respiratory Society. 1551.
58. Halliday SJ, Matthews DT, Talati MH, Austin ED, Su YR, Absi TS, Fortune NL, Gailani D, Matafonov A, West JD, Hemnes AR (2020) A multifaceted investigation into molecular associations of chronic thromboembolic pulmonary hypertension pathogenesis. *JRSM Cardiovasc Dis* 9: 204800402090699.
<https://doi.org/10.1177/2048004020906994>
59. Nukala SB, Tura-Ceide O, Aldini G, Smolders VFED, Blanco I, Peinado VI, Castellà M, Barberà JA, Altomare A, Baron G, Carini M, Cascante M, D'Amato A (2021) Protein network analyses of pulmonary endothelial cells in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Sci Rep* 11: 5583.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-85004-z>
60. Si R, Zhang Q, Cabrera JTO, Zheng Q, Tsuji-Hosokawa A, Watanabe M, Hosokawa S, Xiong M, Jain PP, Ashton AW, Yuan JX -J., Wang J, Makino A (2020) Chronic Hypoxia Decreases Endothelial Connexin 40, Attenuates Endothelium-Dependent Hyperpolarization-Mediated Relaxation in Small Distal Pulmonary Arteries, and Leads to Pulmonary Hypertension. *J Am Heart Assoc* 9: e018327.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.120.018327>
61. Ten Dijke P, Goumans M-J, Pardali E (2008) Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* 11: 79–89.
<https://doi.org/10.1007/s10456-008-9101-9>

Differential Gene Expression in the Lungs of Rats with Experimental Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension

N. S. Vachrushev^{a,*}, L. A. Shilenko^a, A. A. Karpov^{a,b}, D. Y. Ivkin^b, M. M. Galagudza^a,
A. A. Kostareva^a, and O. V. Kalinina^{a,c}

^a*Almazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia*

^b*Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia*

^c*Saint-Petersburg Pasteur Institute*

*e-mail: drabrikos@gmail.com

Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) remains a severe disease with low survival rates in inoperable patients, despite advances in treatment. The molecular mechanisms underlying CTEPH pathogenesis are not fully understood, necessitating further research to identify new therapeutic targets. Although numerous animal models of CTEPH have been developed, demonstrating their clinical relevance requires establishing molecular bioequivalence with human pathophysiological processes, particularly through matching gene expression profiles. To analyze differential gene expression in rat lung tissues following CTEPH modeling using alginate microsphere administration and to assess the applicability of this model for developing and studying new therapeutic strategies for CTEPH. CTEPH was modeled in Wistar rats via repeated intravenous injections of biodegradable alginate microspheres. The transcriptional profile of lung tissue samples collected from CTEPH rats at 2 weeks, 6 weeks, and control rats was analyzed using high-throughput RNA sequencing. Differentially expressed genes (DEGs) were identified using DESeq2. Gene expression changes were validated by reverse transcription PCR (RT-PCR). Transcriptomic analysis revealed that CTEPH modeling at 2 weeks upregulated genes associated with inflammation, whereas at 6 weeks, downregulation of extracellular matrix-related genes was observed. Transcription factor analysis showed predominant regulation of DEG promoters by C2H2 zinc finger proteins Zfp278 and Klf5, suggesting their involvement in the cellular response during CTEPH development. RT-PCR validation of *Cav1*, *Eng*, *vWF*, and *Gja5* expression in a larger set of lung tissue samples confirmed the dynamic changes detected in the transcriptomic analysis. This study identified dynamic transcriptional changes during CTEPH development in rats, including dysregulation of extracellular matrix, inflammation, and endothelial dysfunction-related genes, consistent with current understanding of CTEPH pathogenesis. The findings demonstrate that the developed rat model exhibits transcriptional profile alterations comparable to those observed in human CTEPH, supporting its relevance for preclinical research.

Keywords: Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH), vascular remodelling, RNA sequencing, inflammation, RT-PCR