

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный  
медицинский исследовательский центр кардиологии имени  
академика Е. И. Чазова»  
Институт экспериментальной кардиологии

*На правах рукописи*

**Абрамов Александр Александрович**

**Механизмы регуляции гемодинамики в малом и большом круге  
кровообращения при экспериментальной легочной гипертензии**

Специальность: 1.5.5 Физиология человека и животных

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук,  
Кузьмин В.С.

Москва – 2026

## Оглавление

<b>I. ВВЕДЕНИЕ</b> .....	<b>6</b>
I.1. Актуальность темы исследования .....	6
I.2. Степень разработанности темы .....	7
I.3. задачи исследования .....	8
I.4. Научная новизна исследования .....	9
I.5. Теоретическая и практическая значимость .....	10
I.6. Методология и методы исследования .....	11
I.7. Степень достоверности данных .....	12
I.8. Публикации .....	12
I.9. Апробация материалов научно-квалификационной работы .....	12
I.10. Положения, выносимые на защиту .....	13
I.11. Личный вклад автора .....	13
I.12. Структура работы .....	14
<b>II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	<b>15</b>
II.1. Этиология лёгочной артериальной гипертензии .....	15
II.2.1.1 Патогенез ЛАГ. Нейрогормональный дисбаланс .....	19
II.3. Связь ЛАГ, хронической недостаточности правого желудочка и системной гемодинамической недостаточности .....	20
II.4. Роль вегетативной нервной системы .....	21
II.4.1. Роль симпатической нервной системы (СНС) .....	21
II.4.2. Взаимодействие СНС и ренин-ангиотензин-альдостероновой системы .....	21
II.4.3. Роль парасимпатической нервной системы (ПНС) .....	23
II.5. Участие ренин-ангиотензин-альдостероновой системы в формировании ЛАГ .....	23
II.5.1. «Традиционная» РААС .....	23
II.5.3. Ангиотензин-II и НАДФН-оксидаза .....	38
II.6. Гипоксическая вазоконстрикция – нервонезависимый механизм регуляции сосудистого тонуса лёгочных артерий .....	41
II.6.1. Гипоксическая вазоконстрикция (ГВР). Физиологическое значение .....	41
II.6.2. Гипоксическая вазоконстрикция (ГВР). Механизм .....	41
III.1 Монокроталиновая модель ЛАГ .....	44
III.2 Монокроталиновая модель ЛАГ. Основные проявления на клеточном и молекулярном уровне. ....	45
<b>III. Материалы и методы</b> .....	<b>47</b>
III.1 Экспериментальные животные .....	47
III.2 Индукция ЛАГ и её валидация с помощью ультразвука .....	47
III.3 Изготовление сосудистых катетеров .....	49
III.4 Хирургические манипуляции .....	50
III.5 Экспериментальная установка .....	51

III.6 Исследования сосудистого тонуса в экспериментах на бодрствующих животных <i>in vivo</i> .....	53
III.6.1 <i>Протокол эксперимента по регистрации дозозависимых изменений сосудистого тонуса in vivo («доза-ответ»)</i> .....	53
III.6.2 <i>Предобработка результатов эксперимента по регистрации дозозависимых изменений сосудистого тонуса in vivo («доза-ответ»)</i> .....	54
III.6.3 <i>Аппроксимация результатов эксперимента по регистрации дозозависимых изменений сосудистого тонуса in vivo («доза-ответ»)</i> .....	55
III.7 Исследование барорефлекторной функции у бодрствующих животных <i>in vivo</i> .....	57
III.7.1 <i>Протокол эксперимента по регистрации барорефлекторной реакции</i> .....	57
III.7.2 <i>Предобработка показателей барорефлекторной реакции</i> .....	58
III.7.3 <i>Аппроксимация барорефлекторной реакции логистической кривой</i> .....	59
III.8 Проведение экспериментов по сократимости ЛЖ .....	60
III.9 Исследование изменений реакции гипоксической вазоконстрикции в хронических и острых экспериментах.....	62
III.9.1 <i>Протокол экспериментов по определению реакции малого круга кровообращения на транзиторную гипоксию - ультразвук</i> .....	62
III.9.2 <i>Протокол экспериментов по определению реакции малого круга кровообращения на транзиторную гипоксию - катетер</i> .....	62
III.10 Статистическое моделирование экспериментов на животных с построением моделей со смешанными эффектами, проверка статистических гипотез и визуализация результатов .....	64
III.11 Анализ данных секвенирования транскриптома образцов выносящего тракта правого желудочка и устья легочного ствола.....	68
III.11.1 <i>Выделение РНК</i> .....	68
III.11.2 <i>Подготовка РНК-библиотек и секвенирование</i> .....	68
III.12 Анализ данных секвенирования .....	70
III.12.1 <i>Анализ данных секвенирования. Анализ дифференциальной экспрессии</i> .....	70
III.12.2 <i>Анализ данных секвенирования. Анализ переключения изоформ</i> .....	70
III.12.3 <i>Анализ данных секвенирования. Поиск химерных транскриптов</i> .....	71
IV. Результаты.....	73
IV.1 Тонус сосудов при индукции вазомоторных ответов в сосудистом русле большого круга кровообращения крыс с ЛАГ .....	73
IV.1.1 <i>Морфологические и функциональные признаки ЛАГ у крыс после введения МКТ</i> .....	73
IV.1.2 <i>Максимальная величина изменения САД при действии фенилэфрина у крыс ЛАГ</i> .....	74
IV.1.3 <i>Длительность периода полувозвращения САД к исходному уровню при действии фенилэфрина у крыс с ЛАГ</i> .....	75
IV.1.4 <i>Влияние ангиотензина-II на время полувозвращения и максимальную величину изменения САД, вызванного фенилэфрином</i> .....	75

IV.1.5	<i>Длительность периода полувозвращения и максимальная величина изменения САД, вызванного нитропруссидом натрия у крыс с ЛАГ</i>	76
IV.2	<b>Чувствительность барорецепторной реакции при ЛАГ</b>	76
IV.2.1	<i>Влияние ЛАГ на рефлекторную тахикардию, брадикардию, диапазон и чувствительность барорецепторного рефлекса</i>	76
IV.2.2	<i>Влияние ангиотензина II на диапазон и чувствительность барорецепторного рефлекса при ЛАГ</i>	80
IV.2.3	<i>Изменение парасимпатического компонента барорецепторного рефлекса при ЛАГ</i>	82
IV.2.4	<i>Влияние АТII на парасимпатический компонент барорецепторного рефлекса при ЛАГ</i>	83
IV.3	<b>Сократимость левожелудочкового миокарда при ЛАГ</b>	86
IV.3.1	<i>Влияние ЛАГ на давление, объём и показатели производительности ЛЖ</i>	86
IV.3.2	<i>Влияние преднагрузки на скорость сокращения и расслабления ЛЖ при ЛАГ</i>	88
IV.4	<b>Гипоксическая вазоконстрикторная реакция в малом круге кровообращения при ЛАГ</b>	90
IV.4.1	<i>Гипоксическая вазоконстрикторная реакция в малом круге кровообращения при ЛАГ в исследованиях на УЗИ в хроническом эксперименте</i>	90
IV.4.2	<i>Исследование динамики гипоксической вазоконстрикторной реакции в малом круге кровообращения при зрелой ЛАГ с измерением объёма ЛЖ при помощи тетраполярной импедансографии</i>	93
IV.5.	<b>Транскриптомный профиль ткани выносящего тракта правого желудочка и устья легочного ствола при моделировании ЛАГ</b>	99
IV.5.1.	<i>Транскриптомный профиль тканей выводящего тракта правого желудочка и легочного ствола при моделировании ЛАГ</i>	99
IV.5.2.	<i>Биологические процессы, внутриклеточные процессы и молекулярные компоненты, измененные в наибольшей степени при моделировании ЛАГ</i>	104
IV.5.3.	<i>Экспрессия генов тиреоидной оси при ЛАГ</i>	114
IV.5.4.	<i>Особенности и степень изменения транскрипционного профиля при ЛАГ, обусловленная переключением экспрессируемых изоформ и альтернативным сплайсингом</i>	117
IV.5.5	<i>Степень и особенности нарушений транскрипции с появлением химерных транскриптов при ЛАГ</i>	133
V.	<b>ОБСУЖДЕНИЕ</b>	135
V.1.	<b>Ослабление вазоконстрикторных реакций, вызванных активацией альфа-1-адренорецепторов в большом круге кровообращения</b>	135
V.1.1.	<i>Потенциальные молекулярные механизмы, обуславливающие изменение вазоконстрикторных реакций при ЛАГ</i>	135
V.1.2.	<i>Потенциальные молекулярные механизмы, обуславливающие снижение чувствительности к АТII при ЛАГ</i>	138
V.1.3.	<i>Потенциальные молекулярные механизмы, обуславливающие стабильность дилатационных ответов сосудов большого круга на NO при ЛАГ</i>	140

<b>V.2. Дисфункция барорефлекторной регуляции при ЛАГ .....</b>	<b>141</b>
<b>V.2.1. Дисфункция барорецепторной регуляции ЧСС при ЛАГ.....</b>	<b>141</b>
<b>V.2.2. Ангиотензин II как фактор барорецепторной дисфункции при ЛАГ .....</b>	<b>143</b>
<b>V.5. Абберантный сплайсинг как один из механизмов аутоиммунного ремоделирования сосудистой стенки при ЛАГ.....</b>	<b>148</b>
<b>VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>153</b>
<b>VII. ВЫВОДЫ .....</b>	<b>157</b>
<b>VIII. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>158</b>

## **I. ВВЕДЕНИЕ**

### **I.1. Актуальность темы исследования**

Легочная артериальная гипертензия (ЛАГ) является достаточно распространенным заболеванием, которое сопровождается изменениями в сосудистом русле малого круга кровообращения, приводящими к росту правожелудочкового систолического давления, гипертрофии правого желудочка, увеличению легочного сосудистого сопротивления, нарушению циркуляции и оксигенации крови в малом круге кровообращения. ЛАГ является мультиэтиологическим заболеванием, в основе которого может лежать множество факторов наследственной, гормональной, токсической природы. Развитие ЛАГ сопровождается изменением фенотипа, метаболической активности, способности к пролиферации клеточных элементов стенки легочных сосудов – эндотелия, гладкомышечных клеток (ГМК), фибробластов. Механизмы ремоделирования сосудистой стенки при формировании ЛАГ изучены не полностью. Остаются неизвестными ключевые системные факторы нейрогормональной или иной природы, способствующие перестройке стенки сосудов. Следует отметить, что в настоящее время отсутствуют надежные и безопасные способы фармакологической терапии для всех форм ЛАГ. Встречаемость ЛАГ в настоящее время повышается в связи с увеличением среднего возраста в популяции. Следует отметить, что ЛАГ, как правило отягчается сопутствующими патологиями в сердечно-сосудистой системе, такими как сердечная недостаточность, дисфункции клапанного аппарата сердца, нарушения агрегации крови.

К настоящему моменту накапливаются данные, свидетельствующие в пользу того, что ЛАГ формируется параллельно и сопровождается множественными патологическими изменениями в большом круге кровообращения. Эти изменения ограничиваются не только гипертрофическими изменениями в сердце, но проявляются в нарушении нейрогуморального контроля сосудистого тонуса в большом круге. За пределами легочного круга кровообращения ЛАГ манифестирует в форме недостаточности церебральной циркуляции, сниженного почечного кровотока [Nickel и др., 2017], миопатий, ассоциированных с уменьшением плотности микроциркуляторного русла. Вышеперечисленные изменения, вероятно, обусловлены нарушениями нейрогуморального контроля элементов большого круга, которое определяют как «нейрогормональный дисбаланс», обусловленный ЛАГ. Важно, что, являясь комплексным процессом, ЛАГ приводит к одновременному изменению тонко переплетенной регуляции гемодинамики со стороны симпатического отдела ВНС, ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и системы натрийуретических пептидов.

Ключевыми механизмами быстрой регуляции кровотока, специфическими для большого и малого круга кровообращения, соответственно, являются барорецепторная (БРР) и гипоксическая вазоконстрикторная (ГВР) реакция. Так как БРР и ГВР модулируется РААС следует ожидать изменения функционирования этих реакций при ЛАГ, особенно, при тяжелых и/или терминальных ее формах. Особенности функционирования БРР и ГВР при ЛАГ, а также механизмы их изменения практически не исследованы. Барорецепторная реакция основана на синергической, корегуляции сосудистого русла большого круга, ЧСС и сократимости левого желудочка. В противоположность явлениям в правом желудочке, особенности адаптивной перестройки левожелудочкового миокарда при ЛАГ практически не исследованы.

Несмотря на большой объем работ и публикаций, молекулярные мишени, молекулярно-генетические механизмы, индуцирующие ремоделирование сосудистой стенки, опосредующие гемодинамическую дерегуляцию при ЛАГ остаются не выявленными.

Следует отметить также, что изучение ЛАГ напрямую связано с такими актуальными вопросами фундаментальной физиологии как механизмы клеточного гомеостаза стенки артерий, молекулярные механизмы предотвращения дедифференциации клеток, механизмы поток/NO-зависимой вазодилатации, способы установки в организме глобальных гемодинамических показателей, например, объема циркулирующей жидкости, а также способы корегуляции гемодинамики малого и большого кругов кровообращения. Т.о. исследование «механизмов» ЛАГ является актуальным, т.к. способствует решению целого ряда проблем фундаментальной физиологии сердечно-сосудистой системы.

## **I.2. Степень разработанности темы**

Исследованию ЛАГ посвящено значительно количество как клинических, так и фундаментальных работ. Большинство из этих работ направлены на изучение механизмов формирования функциональных и структурных изменений в малом круге кровообращения, включая сосудистое русло легочных артерий, легочных вен, а также особенности гипертрофии правого желудочка сердца при ЛАГ.

На протяжении последних десятилетий был выяснен ряд тканевых и системных явлений, обуславливающих развитие гипертензии в малом круге кровообращения. Установлено, что формирование ЛАГ связано с фиброзом в стенке мелких артерий малого круга кровообращения, который сопровождается избыточной вазоконстрикцией, тромбозом и ремоделированием сосудистых стенок. Указанные явления приводят в конечном итоге к сердечной и перфузионной недостаточности. Все три указанных явления обусловлены пролиферацией клеток в гладкомышечной обкладке артерий, воспалительными явлениями,

метаболическими нарушениями, избыточной выработкой факторов роста, проконстрикторных соединений. Показано, что ЛАГ может сопровождаться снижением способности эндотелия к секреции вазодилатирующих агентов (оксида азота и простациклинов), усилением секреции эндотелием мелких артерий малого круга проконстрикторных соединений (тромбоксан, эндотелин-1). Несмотря на понимание перечня вовлеченных в формирование ЛАГ регуляторных факторов, глубинные причины изменения регуляторного «паттерна» остаются неизвестными.

ЛАГ сопровождается изменениями автономной регуляции системной гемодинамики [Vaillancourt и др., 2017]. Более того, установлено, что автономная нервная система вовлечена в патогенез ЛАГ. Показано, что при ЛАГ симпатический тонус повышен, а его снижение предотвращает дисфункцию правого желудочка. Предполагается, что увеличенный тонус симпатического отдела ВНС при ЛАГ обусловлен повышенной активностью РААС и повышенным уровнем циркулирующего ангиотензина-II, который является известным стимулятором симпатической активности. Фармакологические воздействия на РААС и рецепторы ангиотензина способствуют восстановлению функций правого желудочка при ЛАГ. В 2018 году установлено, что активность парасимпатических нервов при ЛАГ снижена, и этот феномен способствует дисфункции правого желудочка сердца и ремоделированию в малом круге кровообращения [Silva Gonçalves Bos da и др., 2017]. Следует отметить, что особенности холинергической регуляции в большом круге кровообращения при ЛАГ остаются не исследованными к настоящему времени полностью. Точно также не изучена роль ангиотензина-II в регуляции БРР и ГВР при ЛАГ.

В связи с вышесказанным в настоящей работе поставлена следующая цель: исследовать механизмы регуляции и адаптации гемодинамики в большом круге кровообращения при хронической легочной артериальной гипертензии, индуцированной монокроталином.

### **I.3. задачи исследования**

В соответствии с целью, в работе были поставлены следующие задачи:

1. Выявить функциональные перестройки в левом желудочке сердца, обусловленные легочной артериальной гипертензией (ЛАГ), индуцированной монокроталином в экспериментах *in vivo*.
2. Исследовать барорецепторный контроль сердечного ритма при ЛАГ и оценить модуляцию этого контроля ангиотензином II (АТII).
3. Изучить влияние сформированной ЛАГ на вазомоторные ответы (констрикцию и дилатацию) в сосудистом русле большого круга кровообращения в экспериментах *in vivo*.

4. Оценить влияние гипоксической вазоконстрикторной реакции (ГВР) в малом круге при ЛАГ на гемодинамику большого круга кровообращения, определить чувствительность ГВР к АТШ в экспериментах *in vivo*.
5. Выявить потенциальные механизмы гемодинамической адаптации, наблюдаемые в монокроталиновой модели ЛАГ с помощью транскриптомного анализа.
6. Определить молекулярно-генетические основы ремоделирования стенки сосудов при ЛАГ, индуцированной монокроталином, используя биоинформатические методы анализа транскриптома.

#### **1.4. Научная новизна исследования**

1. В данной работе впервые проведено исследование реактивности сосудов большого круга кровообращения *in vivo* в хронической модели ЛАГ. Впервые показано, что у крыс снижается способность к вазоконстрикции, вызванной активацией  $\alpha 1$ -адренорецепторов фенилэфрином, а также способность поддерживать сосудистый тонус в большом круге кровообращения при сформированной тяжелой форме ЛАГ. Впервые установлено, что у крыс в модели ЛАГ способность восстанавливать сосудистый тонус в большом круге кровообращения после его снижения за счет NO-зависимых механизмов не меняется. Впервые исследовано влияние ангиотензина на вазомоторные реакции в большом круге при ЛАГ. Показано, что ангиотензин-II у крыс с ЛАГ, в отличие от здоровых крыс, не усиливает вазоконстрикторные эффекты фенилэфрина, но наоборот, уменьшает длительность величины констрикторного ответа в большом круге кровообращения. АТШ не влияет на кинетику NO-зависимого изменения артериального давления, но уменьшает величину вазодилатационного ответа в большом круге кровообращения у крыс с ЛАГ у крыс в модели легочной гипертензии.
2. Впервые в экспериментах *in vivo* получены сведения о влиянии хронической ЛАГ на диапазон барорефлекторной (БРР) регуляции ЧСС и чувствительность барорефлекторной реакции. Продемонстрировано, что у крыс с ЛАГ снижается способность компенсаторного увеличения ЧСС, при изменении артериального давления, вызванного донором NO. Таким образом, при ЛАГ диапазон регуляции ЧСС уменьшается. Впервые установлено, что снижение чувствительности БРР происходит преимущественно за счет ослабления симпатического компонента рефлекторной реакции.
3. В представленной работе впервые выявлена неоднотипность влияния хронической ЛАГ на гипоксическую вазоконстрикторную реакцию в малом круге кровообращения. Впервые установлено, что в малом круге кровообращения при продолжительной ЛАГ наблюдается парадоксальная реакция восстановления ГВР в ответ на применение АТШ.

4. Впервые установлено, что гипертензия в малом круге кровообращения оказывает влияние не только на функционирование правого желудочка, но вызывает компенсаторное синергичное усиление чувствительности к растяжению, скорости сокращения и способности к расслаблению в левом желудочке.

5. В работе в результате транскриптомного анализа впервые удалось определить потенциальные механизмы, лежащих в основе изменений вазоконстрикторных ответов в БКК, нарушений БРР, а также в основе наблюдаемых при ЛАГ адаптивных изменений в левом желудочке. Индуцированное ЛАГ снижение способности к поддержанию тонуса сосудами БКК в ответ на прессорные стимулы обусловлено преимущественно уменьшением активности в цитоплазме ключевых регуляторов каскада MLCP – Rho и, в особенности, подавлением экспрессии белка-регулятора CPI-17. При ЛАГ наблюдается сниженная экспрессия  $\beta$ -адренорецепторов 1 и 2 типа, рецепторов АТ-II первого типа, но повышается экспрессия  $\alpha 1$ -адренорецепторов. По всей видимости, именно снижение экспрессии  $\beta$ -адренорецепторов сердца играет ключевую роль в уменьшении рефлекторной тахикардии и диапазона БРР. Увеличение амплитуды кальциевых транзитов в кардиомиоцитах, увеличение скорости удаления  $Ca^{2+}$  из цитоплазмы, в сочетании с повышением экспрессии  $\alpha 1$ -АР способствуют росту индексов, характеризующих сократимость и параметры расслабления левожелудочкового миокарда. Снижение экспрессии рецепторов АТ-II, в сочетании с увеличением экспрессии CNP, BNP и их рецепторов приводит к ослаблению и/или инверсии стимулирующего действия АТ-II.

6. С помощью биоинформатических методов анализа транскриптома в работе впервые установлено, что при хронической ЛАГ наблюдается существенное изменение уровня экспрессии множества генов, вовлеченных в тиреоидную сигнализацию. Полученные результаты впервые позволили сформулировать гипотезу о тиреоидной дискоординации при ЛАГ монокроталинового типа. Кроме того, в работе впервые установлено, что ЛАГ сопровождается увеличением экспрессии генов, ассоциированных с аутоиммунным ответом, увеличением инфильтрационной активности иммунных клеток. В работе впервые установлено, что одним из новых механизмов ремоделирования сосудистой стенки при ЛАГ является изменение типа транскрипционной активности с преобладанием альтернативного сплайсинга и потенциацией изоформенного переключения, приводящего к накоплению продуктов генов, способствующих селекции опухолеподобных свойств у ГМК и эндотелиоцитов.

## **I.5. Теоретическая и практическая значимость**

Результаты, полученные в ходе выполнения данной работы, с теоретической и фундаментальной точки зрения развивают современные представления о регуляторной интеграции большого и малого кругов кровообращения. В работе затрагиваются фундаментальные вопросы сигнализации в симпатическом отделе ВНС и РААС в норме и патологии. Данная работа способствует пониманию фундаментальных причин дисрегуляции гемодинамики при ремоделировании стенки легочных артерий. Данная работа способствует пониманию глубинной роли тиреоидной оси в контроле гемодинамики. В работе раскрываются фундаментальные механизмы синергических перестроек в «правом» и «левом» сердце.

С практической точки зрения, данная работа способствует пониманию границ применения фармакологических средств, направленных на коррекцию системного кровообращения при ЛАГ. Кроме того, практически значимым является выяснение степени вовлеченности симпатического и парасимпатического отдела вегетативной нервной системы в ухудшение барорефлекторного контроля артериального давления и ЧСС при легочной артериальной гипертензии.

#### **1.6. Методология и методы исследования**

В представленной работе для изучения функциональных изменений сосудистого русла, гуморальной и рефлекторной регуляции гемодинамики в большом круге кровообращения проводили эксперименты на крысах *in vivo* в условиях монокроталиновой хронической модели ЛАГ. Для оценки показателей гемодинамики и барорефлекса в хроническом эксперименте использовались техника имплантации устройств прямого сосудистого доступа (VAB, Instech Salomon).

Для выявления функциональных и анатомических различий по мере прохождения эксперимента использовали эхокардиографию и ультразвуковую доплерографию.

Для анализа транскриптомного профиля и биоинформационного анализа изменений транскрипции при ЛАГ осуществляли мРНК секвенирование тканевых образцов, включающих выносящий тракт правого желудочка, ствол и постбифуркационные сегменты легочных артерий.

Для надёжной статистической оценки результатов строили линейные и нелинейные модели со смешанными эффектами в среде R

Эксперименты были проведены на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова; в лаборатории экспериментальной патологии сердца института экспериментальной патологии НМИЦ Кардиологии с

соблюдением всех актуальных правил и норм этического обращения с лабораторными животными.

### **I.7. Степень достоверности данных**

Представленные в работе данные получены с использованием современных общепринятых экспериментальных методик, стандартного научного оборудования и реактивов; эксперименты выполнены с использованием тканей, полученных от достаточного количества лабораторных животных контролируемого содержания; экспериментальные данные проанализированы и представлены в виде численных значений. Первичные экспериментальные данные размещены на открытых серверах и доступны для дополнительного анализа или могут быть получены от автора по запросу.

Статистическая обработка экспериментальных данных выполнена с использованием стандартных методов, в том числе дисперсионного анализа с последующими апостериорными тестами и непараметрическими тестами; эксперименты и результаты, представленные в работе, воспроизводимы. Результаты исследования представлены для ознакомления научному сообществу и опубликованы в рецензируемых научных журналах.

В литературном обзоре используются современные сведения, опубликованные в специализированных научных журналах и изданиях. Гипотезы и механизмы феноменов, предложенные при обсуждении полученных результатов, опираются на общепринятые в научном сообществе концепции, а также классические представления мембранной теории.

В работу вошли исследования, выполненные при поддержке Российского научного фонда (проект №22-15-00189). Результаты работы одобрены экспертами Российского научного фонда.

### **I.8. Публикации**

По теме диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 7 статей в журналах, индексируемых в базах Scopus, Web of Science и RSCI, и 1 патент № 2804734 С1, РФ.

### **I.9. Апробация материалов научно-квалификационной работы**

Результаты данной диссертационной работы были представлены на следующих всероссийских и международных конференциях и съездах: 12-я международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, Россия, 22-26 мая 2023), Ежегодная Всероссийская научно-практическая конференция «Кардиология на марше» (Москва, Россия, 7 июня 2023), XXIV Съезд Физиологического общества им. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия, 11-15 сентября 2023), IV Всероссийская молодежная школа-конференция «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций»

(ЗБС МГУ, Россия, 15-17 сентября 2023), VII Международный конгресс, посвященный А. Ф. Самойлову «Фундаментальная и клиническая электрофизиология. актуальные вопросы современной медицины» (Казань, Россия, 4-7 апреля 2024), Всероссийский научный мини-симпозиум «Ионные каналы сердечно-сосудистой системы в норме и патологии» (Москва, Россия, 18-21 сентября 2024).

#### **I.10. Положения, выносимые на защиту**

1. Хроническая ЛАГ, сопровождаемая снижением наполнения левого желудочка (ЛЖ), приводит к функциональным изменениям в ЛЖ, имеющим компенсаторный характер и направленный на поддержание сердечного выброса. При ЛАГ усиливается зависимость сократимости миокарда ЛЖ от степени его предротяжения.
2. При ЛАГ способность к барорефлекторному увеличению ЧСС уменьшена, что является компенсаторным механизмом для условий хронической симпатоактивации.
3. Хроническая ЛАГ приводит к уменьшению способности сосудов большого круга кровообращения поддерживать тонус и инвертирует потенцирующее действие ангиотензина II на вазоконстрикцию. Ремоделирование малого круга кровообращения приводит к перестройке регуляции сосудистого тонуса в большом круге кровообращения.
4. Вазоконстрикция в легочных артериях, индуцированная гипоксией (ГВР), при хронической ЛАГ приводит к значительному снижению конечно-диастолического и ударного объемов ЛЖ, сердечного выброса. ЛАГ может сопровождаться адаптационным подавлением ГВР, что предотвращает снижение сердечного выброса. АТII способен восстанавливать ГВР при ЛАГ.
5. Индуцированная монокроталином ЛАГ приводит к существенному изменению экспрессии генов, контролирующих сократимость миокарда и гладкомышечных клеток, функционирование вегетативных нервных окончаний, передачу сигналов адренергической и ренин-ангиотензин-альдостероновой «оси».
6. Ключевым фактором ремоделирования стенки сосудов, индуцированного монокроталином, является активация альтернативного сплайсинга и накопление изоформ белков, способствующих инфильтрации стенки сосудов и устойчивости их клеток к апоптозу.

#### **I.11. Личный вклад автора**

Соискатель лично принимал участие во всех этапах работы: планировании экспериментов, подборе диапазона концентраций исследуемых соединений, проведении экспериментов, статистической обработке и обобщении результатов, написании статей и тезисов, представлении результатов работы на российских и международных конференциях.

Личный вклад соискателя Абрамова А.А. заключается в разработке направления исследования, формулировании гипотез и концепции исследования. Соискатель лично осуществлял все этапы диссертационной работы: планирование экспериментов, адаптацию методик, выполнение физиологических, функциональных, молекулярно-биологических экспериментов, изготовление тканевых образцов, проведение *in vivo* экспериментов, анализ данных, статистическую обработку и обобщение результатов, написание статей и тезисов, представление результатов работы на российских и международных конференциях, подготовку текста диссертации.

### **I.12. Структура работы**

Материалы диссертационной работы изложены на 182 страницах. Работа состоит из обзора литературы по выбранной теме, описания материалов и методов, использованных при выполнении данной работы, описания результатов и их обсуждения, а также заключения и выводов. Диссертационная работа проиллюстрирована 50 рисунками и 4 таблицами. Список использованной литературы включает 436 источников.

## **II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **II.1. Этиология лёгочной артериальной гипертензии**

Лёгочная артериальная гипертония (ЛАГ) – относительно редкое заболевание, очень трудно поддающееся лечению. На текущий момент лёгочная артериальная гипертензия (ЛАГ) определяется как хроническое возрастание среднего и систолического артериального давления в легочной артерии (оно превышает 25 мм рт. ст. в покое и более 30 мм рт. ст. при физической нагрузке, при давлении заклинивания <15 мм рт. ст. и сосудистом сопротивлении >3 вуда.) [McLaughlin и др., 2015]. Патогенез данного заболевания разнообразен и может происходить от разнообразных причин, в то же время он остаётся недостаточно изученным. В связи с этим фактом существует несколько экспериментальных моделей ЛАГ.

При длительной некомпенсированной ЛАГ развивается ремоделирование сосудистой стенки в малом кругу кровообращения, нарушается нормальный газообмен, а повышенная нагрузка на правый желудочек приводит к гипертрофии миокарда, а затем и к правосердечной недостаточности, т.н. «хроническому лёгочному сердцу». ВОЗ отнесла ЛАГ в первую группу заболеваний [Studer, Gilkin, 2014].

Согласно данным самого большого регистра REVEAL (Registry to Evaluate Early and Long-term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management) однолетняя выживаемость пациентов - 85%, 3-х летняя 68%, 5-тилетняя 57%, 7-ми летняя 49%. От появления симптомов до постановки диагноза проходит в среднем 2,5 года. Кроме того, прямая стоимость обслуживания больных с ЛГ до 4-х раз выше, чем у пациентов без ЛГ [Studer, Gilkin, 2014].

Данные регистров показывают, что среди больных ЛАГ преобладают женщины. На одного мужчину приходится 2-4 женщины. Это может быть связано с недиагностированными аутоиммунными заболеваниями – так в двух наибольших регистрах ЛАГ отношение больных аутоиммунных заболеваний соединительной ткани женщин к мужчинам составляет 9:1 [Batton и др., 2018]. По всей видимости это связано с т.н. «эстрогеновым парадоксом», которая присутствует в заболеваемости и выживаемости при ЛАГ, когда женщины имеют повышенный риск заболеть ЛАГ и в тоже время имеют большую выживаемость [Foderaro, Ventetuolo, 2016]

### **II.2. Патогенез ЛАГ**

Выделяют два ведущих компонента в патогенезе легочной артериальной гипертензии: функциональный и анатомический.

Функциональный компонент заключается в смещении кровотока в альвеолы с большим парциальным давлением кислорода и возникновении спазма сосудов, питающих плохо

вентилируемые участки (рефлекс Эйлера-Лильестранда или т.н. гипоксическая вазоконстрикция)[Sommer и др., 2008]. Реакция крупных и мелких лёгочных артерий на гипоксию при этом различается диаметрально - крупные лёгочные артерии, как и системные, отвечают расслаблением, в то время как наиболее выраженная вазоконстрикция наблюдается в артериях 200 - 300 мкм диаметром т.н. резистивных артериях [Madden, Dawson, Harder, 1985; Shirai, Sada, Ninomiya, 1986]. В норме этот рефлекс снижает кровоток вокруг маловентилируемых альвеол и таким образом предотвращает гипоксемию. При патологии он увеличивает сосудистое сопротивление и, тем самым, провоцирует лёгочную гипертензию. Эффекты острой гипертензии обратимы [Yildiz, 2009]. Однако, в случае хронической гипоксии наступают необратимые анатомические изменения [Farber, Loscalzo, 2004].

Анатомический компонент состоит в облитерации сосудистого русла, разрастании соединительной ткани, замещении функциональных элементов сосудистой стенки на фибробласты [Stenmark, McMurtry, 2005; Voelkel, Tuder, 2000]. Ремоделирование происходит во всех слоях сосудистой стенки. В нём участвуют и эндотелиальные, и гладкомышечные клетки [Humbert и др., 2004]. В присутствии хронической гипоксии ремоделирование включает в себя мускуляризацию немышечных лёгочных артерий [Stenmark, Fagan, Frid, 2006]. Выделяют следующие морфологические признаки ЛАГ в сосудистой стенке лёгочных артерий:

- интимальная гиперплазия
- медиальная гипертрофия и гиперплазия
- пролиферация адвентиции
- формирование неоинтимы
- плексиформные поражения

Формирование неоинтимы и плексиморфные поражения сосудов лёгких представляют собой характерные черты ЛАГ у человека, которые не воспроизводятся в наиболее доступных животных моделях ЛАГ – гипоксической и монокроталиновой. На сегодняшний день не существует животной модели ЛАГ, воспроизводящей все морфологические признаки человеческой ЛАГ, поэтому вопрос создания более адекватных животных моделей остаётся актуальным и новые модели продолжают появляться.

Одной из таких новых моделей является модель ингаляции мышам частиц с домашним пылевым клещом (home domestic mite - HDM) [Steffes Lea C. и др., 2020]. Это модель аллергического генеза, при которой воспроизводится формирование неоинтимы, и это модель – первая, при которой формирование неоинтимы удалось проследить и выявить из

каких клеток она образуется. В данной модели неоинтима формируется пролиферирующими клетками-основателями из ГМК медики на шестую неделю после ингаляции HDM. Эти клетки проходят через эластиновую мембрану и вытягиваются выстраиваются в стенке соосно сосуду, в отличие от обычных ГМК медики, которые уложены перпендикулярно оси сосуда. После выхода клетки-основатели начинают делиться, формируя клеточные пучки толщиной 30-60 клеток и длиной 1-2 клетки. 90% популяции ГМК, формирующих неоинтиму, экспрессируют рецептор Notch3 на уровне, превышающим таковой в ГМК здоровых животных. При этом блокада сигналинга через этот рецептор с помощью ингибитора  $\gamma$ -секретазы дибензазипина (DBZ) на вторую-четвёртую неделю останавливала изменение фенотипа ГМК, выход ГМК из медики и формирование неоинтими. Утолщение медики в этой модели также обусловлено пролиферирующими ГМК, однако DBZ не останавливал пролиферацию клеток в медики и в неоинтими. Ранее было показана оверэкспрессия Notch3-рецептора и его внутриклеточного домена NICD3 ГМК, взятыми у больных ЛАГ из лёгочных артерий, а также снижение ими экспрессии смузелина (маркёр зрелых ГМК) и значительное увеличение скорости роста по сравнению с ГМК из лёгочных артерий без ЛАГ [Li и др., 2009].

Notch-рецепторы – это рецепторы межклеточного взаимодействия, которые регулируют клеточное созревание и дифференцировку [Artavanis-Tsakonas, Rand, Lake, 1999]. Семейство Notch-рецепторов состоит из четырёх рецепторов Notch1-4. Notch-рецептор состоит из одинакового для всех рецепторов внеклеточного домена (Notch extracellular domen - NECD), который нековалентно соединён с внутриклеточным доменом (Notch intracellular domen - NICD). Для Notch-рецепторов существуют различные лиганды, экспрессируемые на поверхности других клеток - Jagged белки (Jag 1, 2) и Delta-like protein-белки (Dll 1, 3, 4) [Koran, Pagan, 2009]. Notch-рецепторы экспрессируются на всех клеточных элементах лёгочной сосудистой стенки. В адвентиции экспрессируются Notch2 и Notch3, в ГМК медики - Notch1, Notch3 и лиганд Jag1, в эндотелии - Notch1, Notch4 и лиганд Jag1, Dll1, Dll4 [Morris и др., 2019]. Связывание лиганда с рецептором приводит к отщеплению NICD и его транслокации в ядро, где он действует в качестве транскрипционного фактора. Отщепление производится в две стадии. В первой стадии отщепление происходит металлопротеиназами ADAM (ADAM10, ADAM17), на второй стадии отщепление производит  $\gamma$ -секретазы [Morris и др., 2019, с. 3]. У активированного отщеплением NICD в ядре мишенями являются гены из семейств *HES* и *HEY*, которые кодируют транскрипционные факторы, являющиеся реперессорами транскрипции для многих других генов [Koran, Pagan, 2009]. Notch3 является важным рецептором для формирования сосудов в эмбриогенезе – у нокаутных по Notch3 мышей в раннем постнатальном периоде

наблюдаются анатомические отличия, а также уменьшение экспрессии  $\alpha$ - и  $\gamma$ -SMA, SM22 $\alpha$ , кальпонины, тяжёлых цепей миозина гладких мышц, а также нарушение экспрессии и локализации смузелина – маркёра зрелых ГМК как в системных, так и в лёгочных артериях [Domenga и др., 2004; Ghosh и др., 2011]. В то же время в определённых условиях сингаллинг через Notch3 может приводить к изменению «фенотипа» зрелых ГМК с «сократительного» на «синтетический» [Morris и др., 2019]. Изменение фенотипа происходит при регенерации повреждённой сосудистой стенки, например, в результате нанесения раны. Однако, это также происходит при сердечно-сосудистых заболеваниях, в частности, при лёгочной гипертензии [McDonald и др., 2012]. В научной литературе последнего десятилетия устоялось использование термина «фенотип» для обозначения набора признаков, которые приобретают клетки, формирующие сосудистую стенку, в результате комплексных изменений, происходящих при сердечно-сосудистых патологиях. Эти термин употребляют, имея в виду, что соответствующие клетки при патологии демонстрируют происходящие на разных уровнях клеточной организации, воспроизводящиеся и устойчивые изменения в клеточной физиологии. Характер этих изменений и их количество позволяет говорить о переходе клетки с развитием патологии из одного состояния в другое. В условиях оверэкспрессии конститутивно активных NICD1 и NICD3, в присутствии TGF- $\beta$ 1 и при активации Notch3 в ГМК происходит снижение экспрессии маркёров «сократительного» фенотипа –  $\alpha$ -актина, кальпонины, миозина и смузелина [Morrow и др., 2005]. Смена фенотипа ГМК под действием сингаллинга через Notch3 модулируется транскрипционными факторами KLF4 и KLF5, которые в норме экспрессируются на низком уровне, но при сердечно-сосудистых патологиях их уровень в клетке растёт [Morris и др., 2019]. KLF4 подавляет пролиферацию и индуцирует экспрессию генов сократительного фенотипа в ГМК [Zheng и др., 2009]. KLF5, напротив, провоцирует пролиферацию и ремоделирование сосудистой стенки через HIF-1 $\alpha$  в модели гипоксической ЛАГ [Li и др., 2015]. AT-II сингаллинг повышает экспрессию KLF5, который в свою очередь повышает экспрессию TGF- $\beta$  и PDGF-A, индуцируя пролиферацию ГМК и фибробластов и приводя к гипертрофии сердца, утолщению сосудистой стенки, а также к интерстициальному фиброзу [Shindo и др., 2002]. В то же время длительная инфузия AT-II – на протяжении нескольких дней – приводит к снижению уровня экспрессии KLF5 в ГМК, которое, в свою очередь ведёт к снижению экспрессии eIF5a – одного из регуляторов динамики митохондрий, индукции деления митохондрий, повышения уровня АФК и клеточному старению [Ma и др., 2020].

Часто случается, что ЛАГ ассоциирована с мутацией в гене рецептора II типа костного морфогенетического белка [Atkinson и др., 2002; Davies, Morrell, 2008]. Нарушение экспрессии или передачи сигнала через этот рецептор ведут к подавлению апоптоза и

провоцируют пролиферацию [Atkinson и др., 2002]. В то же время это не ключевой участник патогенеза ЛАГ [McMurtry и др., 2007]. К пролиферации фибробластов и гладкомышечных клеток из лёгочных артерий ведёт усиление сигнала через ET<sub>A</sub>-рецептор [Hassoun и др., 1992].

В сосудистой стенке нарушается биосинтез NO и реакция на него [Yildiz, 2009]. Помимо этого, нарушается баланс про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов. Усиливается агрегация и адгезия тромбоцитов. Увеличивается активность факторов свёртывания.

Все вышеперечисленные изменения приводят к увеличению сосудистого сопротивления в малом круге кровообращения и увеличению постнагрузки на правый желудочек. Надо отметить, что в связи с неспецифичностью симптомов болезни, проходит довольно много времени, пока её получается идентифицировать. Окончательная верификация требует катетеризации правого желудочка. Страх пациентов перед этой инвазивной процедурой и её малодоступность дополнительно затягивает и затрудняет постановку диагноза. Всё вышеперечисленное приводит к тому, что большая часть пациентов с ЛАГ теряют время и начинают лечить уже сформировавшуюся патологию.

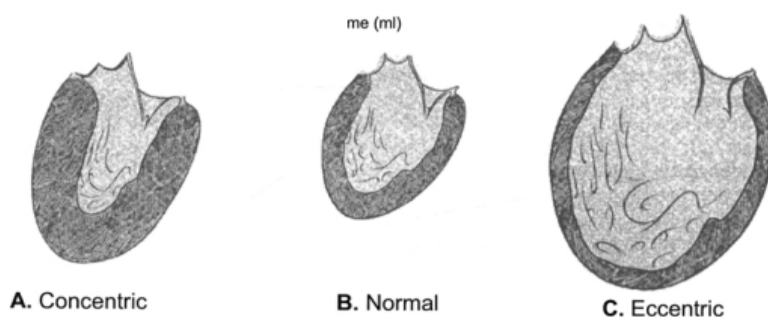
За последние 30 лет произошёл значительный прогресс в области средств медикаментозного снижения давления в малом круге, что позволило повысить трёхлетнюю выживаемость с 40% до 70-80% [M. Ноерг и др., 2017]. В этот момент на передний план выходят вопросы эффективной терапии правожелудочковой сердечной недостаточности, так как именно она в итоге становится главным фактором, влияющим и на качество жизни, и на смертность [Lan и др., 2018], для которой стандартная терапия левожелудочковой сердечной недостаточности не даёт необходимых эффектов [Hemnes, Brittain, 2018].

### **II.2.1.1 Патогенез ЛАГ. Нейрогормональный дисбаланс**

С течением ЛАГ возникает и по мере развития патологии усиливается нейрогормональный дисбаланс. Под этим термином понимается состояние, при котором в патогенез вовлечено много различных циркулирующих в кровотоке молекул, обладающих эндо- и паракринной активностью. Внутриклеточные пути проведения от этих молекул часто взаимодействуют друг с другом. Далее будут приведены сведения об основных регуляторных факторах, которые вовлечены в ЛАГ

### II.3. Связь ЛАГ, хронической недостаточности правого желудочка и системной гемодинамической недостаточности

Самой тяжёлой коморбидностью ЛАГ является хроническая недостаточность правого желудочка [Mehra и др., 2014]. В отличие от левого желудочка, который адаптирован к сокращению при высокой постнагрузке (высоком диастолическом давлении в большом круге кровообращения), правый желудочек приспособлен к работе в сосудистой сети малого круга с низким давлением, поэтому при ЛАГ недостаточность правого сердца развивается быстрее, чем левого. Ключевым фактором, приводящим к правожелудочковой недостаточности при ЛАГ является растущее лёгочное сопротивление, которое увеличивает постнагрузку на правый желудочек и ведёт к его гипертрофии [Theppan и др., 2018]. Гипертрофию правого желудочка, так же как и гипертрофию левого желудочка, разделяют на адаптивную и патологическую (маладаптивную) [Ishak Gabra и др., 2019]. Адаптивная гипертрофия преимущественно концентрическая (рис. 2.3.1 А), которая достигается за счёт увеличения размера кардиомиоцитов, в то время как маладаптивная гипертрофия – эксцентрическая (рис. 2.3.1. С), которая сопровождается комплексом анатомических, гистологических и функциональных изменений (часть из которых необратима), таких как дилатация желудочка, замена функционального миокарда на соединительную ткань, уменьшение доли гликолиза в энергетическом метаболизме кардиомиоцитов [Fang и др., 2012] и падение сократимости [Katz, 2008].



**Рис 2.3.1.** Концентрическая и эксцентрическая гипертрофия. С изменениями по [Katz, 2011]

Падение сократимости правого желудочка приводит к уменьшению наполнения левого желудочка и уменьшению среднего артериального давления, что в свою очередь ведёт к активации ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС) и симпатки [Groeneveldt, Man de, Westerhof, 2019]. Активация РААС ведёт в том числе к удержанию воды и увеличению объёма циркулирующей жидкости, что дополнительно перерастягивает правый желудочек и ухудшает его функцию, таким образом стимулируя петлю патологической обратной связи, усугубляя гемодинамическую недостаточность.

## **II.4. Роль вегетативной нервной системы**

### **II.4.1. Роль симпатической нервной системы (СНС)**

*Вегетативная иннервация артерий малого круга кровообращения.*

Симпатические преганглионары из T1-L2 сегментов спинного мозга соединяются в пре- и паравертебральном ганглиях с постганглионарными нейронами [Vaillancourt и др., 2017], которые иннервируют лёгкие, лёгочные артериолы и вены, либо прямо иннервируют надпочечники [Barnes, Liu, 1995]. При этом у человека симпатические и парасимпатические волокна большей частью локализованы в общих ганглиях и сосудистых пучках [Tan и др., 2007].

*Экспрессия адренорецепторов в сосудах малого круга.*

Лёгочные сосуды у человека экспрессируют  $\alpha 1$ -адренорецептор в количестве, достаточном для сопоставимой с резистивным сосудом констрикции [Rudner и др., 1999]. Также человеческие лёгочные сосуды экспрессируют  $\beta 1$ - и  $\beta 2$ -адренорецепторы, эффекты которых противоположены таковым от  $\alpha 1$ -адренорецептора в отношении 1:3 [Barnes, Liu, 1995]. Правый желудочек у человека экспрессирует  $\beta 1$ - и  $\beta 2$ -адренорецепторы в соотношении 70:30, а также  $\beta 3$ -адренорецепторы, чьи эффекты противоположены положительным инотропным эффектам  $\beta 1$ - и  $\beta 2$ -адренорецепторов [Bylund и др., 1994; Rozec и др., 2009].

*Роль симпатического отдела ВНС в формировании ЛАГ.*

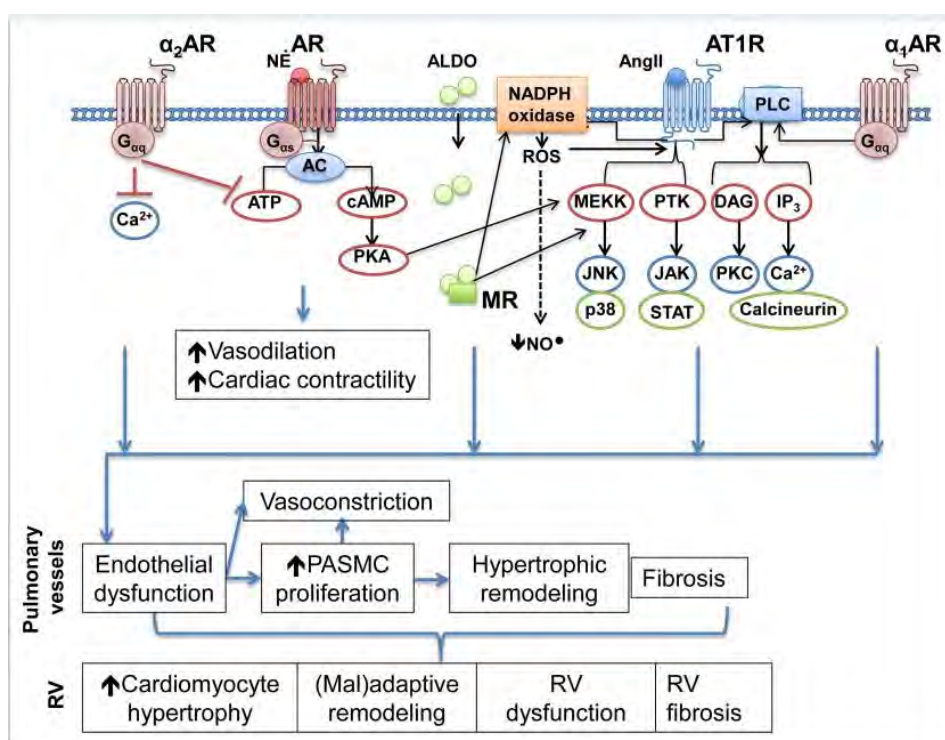
На больных ЛАГ напрямую продемонстрирован повышенный симпатический тонус с помощью регистрации активности мышечных симпатических нервов [Velez-Roa и др., 2004], а также при изучении показателей вариабельности сердечного ритма [Wensel и др., 2009]. Применение адrenoблокаторов на животных моделях ЛАГ либо облегчают её течение [Okumura и др., 2015], либо не допускают развития ЛАГ [Ishikawa и др., 2009]. Облегчает течение ЛАГ блокада симпатического шейного ганглия [Na и др., 2014], а также денервация лёгочной артерии [Chen и др., 2015].

### **II.4.2. Взаимодействие СНС и ренин-ангиотензин-альдостероновой системы**

СНС активно взаимодействует с РААС на двух уровнях. Во-первых, СНС прямо стимулирует РААС, так как иннервация почек и почечной артерии преимущественно симпатическая. Это важное звено патологического процесса при развитии ЛАГ, что демонстрируют опыты по денервации почечной артерии на собаках [Hu и др., 2015] и крысах [Liu и др., 2017b], в которых демонстрируется снижение уровня коллагена в правом желудочке, лёгочной ткани и лёгочных сосудах. Денервация почечной артерии на крысах также приводит к положительным гемодинамическим эффектами – уменьшается

ремоделирование сосудов МКК, постнагрузка на правый желудочек и его диастолическая жёсткость [Silva Gonçaves Bos da и др., 2017].

Во-вторых, существует взаимодействие между путями проведения сигнала от адренорецепторов, ассоциированных с  $\alpha_q$ - и  $\alpha_s$ -субъединицами, и АТ1-рецептором к ангиотензину (рис. 2.4.1). PLC опосредует быстрые эффекты от АТ1-рецептора и адренорецепторов, ассоциированных с  $\alpha_q$ -субъединицами. Адренорецепторы, ассоциированные с  $\alpha_q$ -субъединицей, через РКА влияют на тирозинкиназный путь проведения сигнала (MEKK→JNK→p38), который активируется локально растущей концентрацией АФК и другим участником РААС – альдостероном.



**Рис 2.4.1** Взаимодействие между сигналом от адренорецепторов и сигналом от РААС (с изменениями по [Maron, Leopold, 2015])

### **II.4.3. Роль парасимпатической нервной системы (ПНС)**

У человека сосуды МКК иннервируются в основном парасимпатическими нейронами, тела которых расположены в двойном ядре (nucl. ambiguous), которое входит в состав переднего ядра блуждающего нерва [Hadziefendic, Nahhiu, 1999]. Аксоны от них протягиваются к своим мишеням через бронхолёгочные ответвления блуждающего нерва [Ntiloudi и др., 2019]. Плотность холинергической иннервации снижается от центра к периферии, так же, как и у адренергических волокон. Однако, по сравнению плотность парасимпатической иннервации лёгких ниже по сравнению с плотностью симпатической иннервации [Kummer, 2011]. Стимуляция эфферентов блуждающего нерва вызывала выброс ацетилхолина и NO-опосредованное расслабление сосудов лёгочного русла [McMahon, Hood, Kadowitz, 1992]. При этом ацетилхолин подавлял выброс из адренергических терминалей [Knight и др., 1981].

С развитием ЛАГ ПНС подавляется. На монокроталиновой модели по данным полнотранскриптомного секвенирования с каждой неделей в лёгких падает экспрессия холинорецепторов – M2AchR, M3AchR, а также  $\alpha$ -7nAchR и  $\alpha$ -2nAchR, зато растёт экспрессия глутаматных рецепторов [Xiao и др., 2020]. Ранее da Silva Gonçalves Bos и коллеги провели трансляционное исследование [Hemnes, Brittain, 2018], и показали с помощью исследования спектральных характеристик variability сердечного ритма, что применение орального блокатора ацетилхолинэстеразы – парастигмина стимулирует ПНС на животной модели, а также облегчает течение ЛАГ у пациентов. Помимо этого, парастигмин увеличивал сократимость правого желудочка, уменьшал его жёсткость и уменьшал постнарузку на правый желудочек. В то же время в этой работе не фиксируется снижения уровня M2AchR и  $\alpha$ -7nAchR.

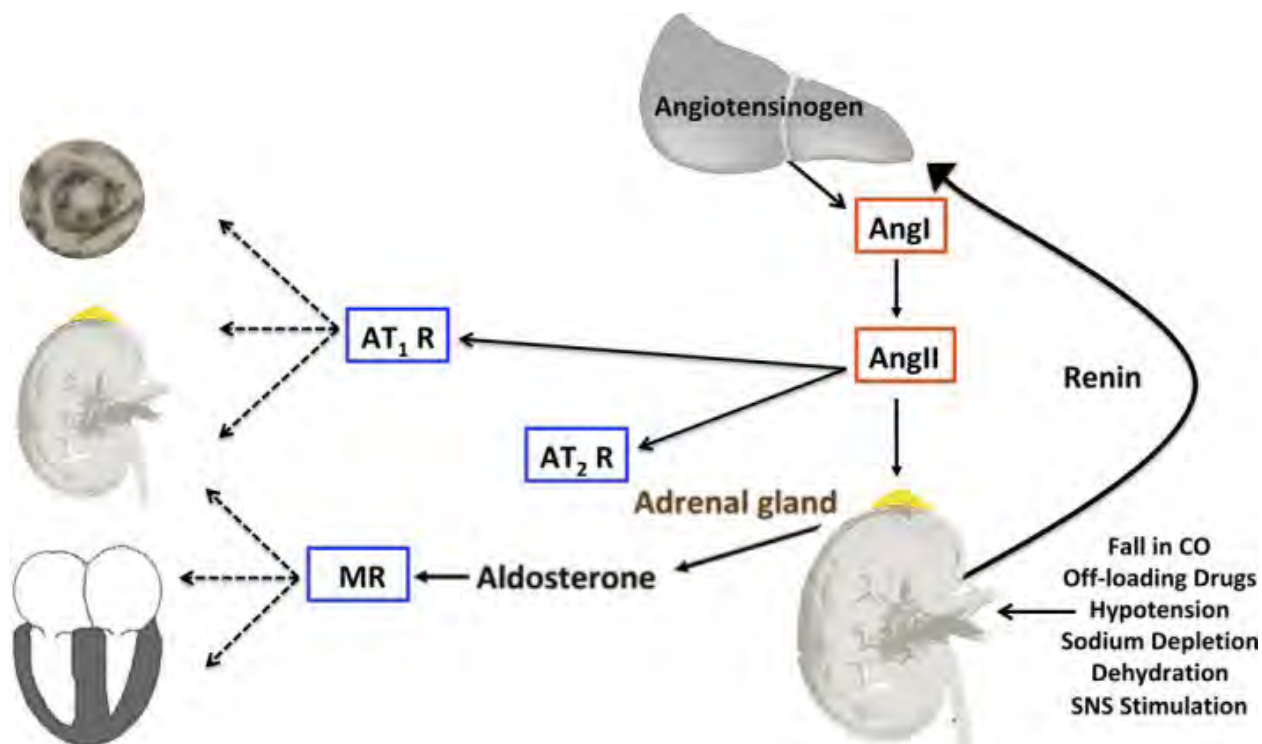
## **II.5. Участие ренин-ангиотензин-альдостероновой системы в формировании ЛАГ**

### **II.5.1. «Традиционная» РААС**

Ренин образуется в результате расщепления препроренина, который синтезируется в юкстагломерулярных эпителиоидных клетках. Далее препроренин расщепляется до проренина, который либо выбрасывается в кровоток, либо превращается далее в ренин и запасается в секреторных гранулах. Гранулы экзоцитируются контролируемым образом, и его концентрация в крови является лимитирующим интенсивность каскада превращений РААС фактором для многих видов [Ames, Atkins, Pitt, 2019]. Стимуляция выброса ренина происходит при гиповолемии, снижении САД, недостатком натрия или активации СНС.

Ангиотензиноген синтезируется в печени и присутствует в кровотоке в избытке по сравнению с ренином. Ренин является протеазой (ангиотензиногеназой) и катализирует

расщепление ангиотензиногена с образованием ангиотензина-I (АТ-I) (рис. 2.5.1). Ангиотензин-превращающий фермент (АПФ), выбрасываемый эндотелиальными клетками, высвобождает ангиотензин-II (АТ-II) [Boron, Boulpaer, 2012]. Эндотелий лёгких наиболее насыщен АПФ.



**Рис 2.5.1** Основные элементы РААС. Взято с изменениями по [Ames, Atkins, Pitt, 2019]

Исходно, АТ-II присутствует в кровотоке в количествах, недостаточных для системного подъёма давления. Однако, связываясь со своим рецептором АТ1 на мембране гладкомышечных клеток, он активирует PLC и запускает выход  $Ca^{2+}$ , что приводит вазоконстрикции. Помимо вазоконстрикторной функции, АТ-II прямо стимулирует надпочечники для выброса в кровь альдостерона (рис. 2.5.1), а также увеличивает сократимость миокарда и потенцирует выброс норэпинефрина симпатическими терминалями [Boron, Boulpaer, 2012]. Недавно было показано, что стимуляция АТ1R в хромоафинных клетках мозгового слоя надпочечников приводит к выбросу везикул с катехоламинами через ранее неизвестный путь активации катионного канала TRPC3 путём формирования его комплекса и прямого белок-белкового взаимодействия с  $\beta$ -аррестином-1, рекрутированной PLC $\gamma$  и ангиотензиновым рецептором АТ1R [Liu и др., 2017a]. Предполагается, что этот механизм может также участвовать в секреции альдостерона корковым слоем надпочечников. АТ-II также является индуктором пролиферации гладкомышечных клеток, тромбообразования и воспаления [Senchenkova и др., 2018; Zeng и др., 2018].

др., 2018]. Индукция пролиферации ГМК под действием АТ-II, происходит с увеличением экспрессии KLF5, которое пропадает под действием лазартана [Gao и др., 2006]. Действие АТ-II на ГМК не ограничивается стимуляцией пролиферации. Продолжительные воздействия повышенных концентраций АТ-II на ГМК сосудов приводят к дедифференциации этих клеток и смене т.н. «сократительного фенотипа» на «синтетический» [Truong, Anand-Srivastava, Srivastava, 2020]. Это явление также получило название «фенотипическое переключение» (“phenotypic switch”) [Yang и др., 2017, с. 2]. В здоровых сосудах ГМК имеют «сократительный фенотип», который выражается в том, что эти клетки экспрессируют преимущественно сократительные белки, не делятся и не мигрируют. Под воздействием различных (в т.ч. патологических) стимулов происходит «фенотипическое переключение», в результате которого ГМК сосудов снижают экспрессию сократительных белков и вместо этого начинают активно экспрессировать компоненты сосудистого матрикса, пролиферировать и мигрировать [Owens, Kumar, Wamhoff, 2004a]. «Фенотипическое переключение» ГМК относят к одним из звеньев сосудистых заболеваний, таких как атеросклероз и аневризма аорты [Eliа и др., 2018]. «Фенотипическое переключение» при сердечно-сосудистой патологии, связанное с повышением уровня АТ-II, сопровождается увеличением экспрессии транскрипционного фактора KLF9 – одного из основных внутриклеточных регуляторов «фенотипического переключения» и одной из двух основных субъединиц димера - p22phox для ферментов NOX 1-4 [Tang и др., 2019]. Помимо сингаллинга через АТ-II в качестве молекулярных основ «фенотипического переключения» при сосудистых патологиях на текущий момент идентифицирован сигналинг через TGFβ1 и IL-11 [Lim и др., 2020].

АТ-II обнаруживается также в разных отделах мозга: в гипоталамусе, в субформикальном и циркумвентрикулярном органах. В гипофизе, гипоталамусе и эпифизе присутствует рениновая активность [Phillips, Oliveira de, 2008]. Присутствие паракриной РАС показано в чёрной субстанции и в стриатуме у приматов и людей [Labandeira-Garcia и др., 2020]. Принято считать, что основной ролью АТ-II в мозге является «тюнинг» работы сердечно-сосудистой системы, а также поддержания водно-электролитного баланса. Центральная инфузия АТ-II приводит к вазоконстрикции, жажде, выбросу вазопрессина и активации симпатической нервной системы [Phillips, 1987]. В последнее десятилетие это представление расширяется. Так, показана регуляция аксонального синтеза норэпинефрина и дофамина путём модуляции трафика и экспрессии тирозин-гидроксилазы и дофамин-β-гидроксилазы [Aschrafi и др., 2019]. Отмечается кросстолк и димеризация между АТ1R и D2-дофаминовыми рецепторами в нейронах чёрной субстанции и стриатума. При гиперактивации паракриной РАС мозга усиливаются нейродегенеративные заболевания,

процессы нейровоспаления и гибель дофаминэргических нейронов [Labandeira-Garcia и др., 2020]. Также центральная инфузия АТ-II влияет на барорефлекторную регуляцию ритма сердца [Head, Saigusa, Mayorov, 2002].

Однако, влияние на барорецепторную регуляцию происходит не только при центральном введении АТ-II. С помощью пэтч-клямпа на крысах было показано, что аппликация АТ-II к чувствительным нейронам узлового ганглия (нижнего ганглия блуждающего нерва) подавляет  $Na_v$ -ток, а микроинъекция АТ-II в узловатый ганглий снижает чувствительность барорефлекса [Zhang и др., 2015]. Подавление  $Na_v$ -тока под действием АТ-II полностью снималось лозартаном. Эта же группа исследователей показала гиперэкспрессию АТ1R на нейронах узлового ганглия у крыс с хирургически вызванной сердечной недостаточностью. Также АТ-II активирует HCN-каналы и усиливает их экспрессию через АТ1R в нейронах узлового ганглия, что дополнительно снижает активность чувствительных нейронов [Tu, Zhang, Li, 2018]. АТ-II опосредованно снижает активность и самих барорецепторов за счёт увеличения механической жёсткости сосудистой стенки из-за АТ-II-индуцируемой пролиферации ГМК и синтеза матрикса [Prasad и др., 2015].

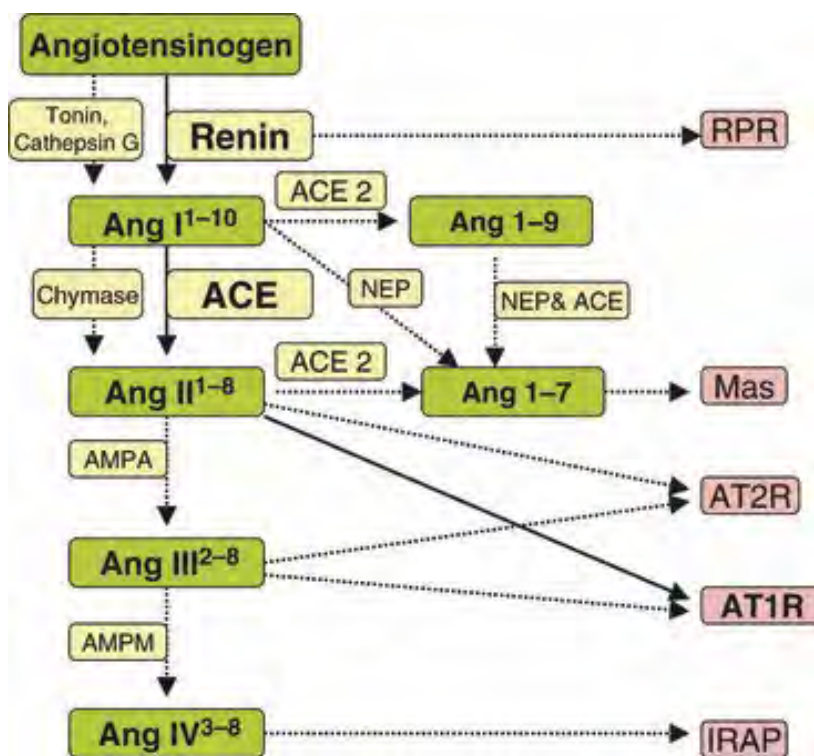
Одним из недавно идентифицированных регуляторов тонуса сосудов является окружающий большую часть из них периваскулярная жировая ткань. В крупных сосудах он располагается сразу за сосудистой стенкой, в небольших сосудах не выделяется граница между адвентицией и периваскулярной жировой тканью [Tinajero, Gotlieb, 2020]. Периваскулярный жир находят в сосудах разных органов и тканей, за исключением сосудов, питающих нервы, и лёгочных сосудов [Saxton и др., 2019]. В настоящее время жировую ткань подразделяют на белый, бурый, коричневый, бежевый и розовый жир [Saxton и др., 2019]. Последний существует только в молочных железах на момент лактации, по окончании которой он трансформируется обратно в белый жир [Morgani и др., 2004]. Цвет жировой ткани придают митохондрии. Основным маркером «цветного» жира является экспрессия UCP-1. Периваскулярный жир тоже экспрессирует UCP-1 и другие маркеры бурого жира, однако интенсивность их экспрессии и конкретный молекулярный репертуар зависят от сосудистого бассейна [Grigoras и др., 2019]. Периваскулярный жир помимо чисто механической защитной функции, которую ему отводили ранее, может участвовать в термогенезе, но его главной функцией является эндо- и паракринная функция [Brown и др., 2014]. Он выделяет набор адипокинов, цитокинов, низкомолекулярных биологически активных веществ (NO, АФК) и гормонов, которые оказывают влияние на сосудистый тонус и в целом на фенотип сосудистых ГМК и фибробластов [Saxton и др., 2019]. Периваскулярный жир также экспрессирует и компоненты РАС: ангиотензиноген, АПФ,

ангиотензиновые рецепторы. Также периваскулярный жир продуцирует ангиотензин 1-7 и АТ-II. Как оказалось, продукция периваскулярным жиром АТ-II является необходимым для поддержания сосудистого тонуса. Группа Юджина Чена продемонстрировала, что системное среднее АД у мышей зависит от циркадной экспрессии транскрипционного фактора *Bmal1*, мишенью которого является ген ангиотензиногена [Chang и др., 2018]. Мыши с тканеспецифичным нокаутом *Bmal1* и/или ангиотензиногена в периваскулярном жире демонстрировали сниженное АД без циркадных колебаний, которые существуют у мышей дикого фенотипа. Кроме того, эта группа показала, что многосуточная инфузия АТ-II уменьшает экспрессию *Bmal1*. При этом также исчезало характерное для времени сна снижение системного АД.

Последним элементом РААС является альдостерон. Секреция альдостерона находится под контролем АТ II. Активация рецепторов АТ-1 клеток клубочковой зоны надпочечника приводит к усилению активности альдостеронсинтазы в митохондриях и синтезу альдостерона. Активированные рецепторы альдостерона транслоцируются в ядро, где происходит их гомодимеризация, связывание в составе коактивационного комплекса NRE-последовательностью в промоторах целевых генов. Альдостерон активирует транскрипцию генов белков, отвечающих за трансэпителиальный транспорт ионов  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}/\text{H}$  – обменник, ENaC,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump, serum and glucocorticoid induced kinase or SGK1). В норме, от 2% до 3% выводимого  $\text{Na}^+$  находится под регуляцией альдостерона, но это достаточно, чтобы эффективно регулировать объём циркулирующей крови. [Boron, Boulpaep, 2012]. Альдостерон также является участником патогенеза ЛАГ [Maron, Leopold, Hemnes, 2020].

## II.5.2. Ангиотензин. Синтез

В настоящий момент (рис. 2.5.2) на ангиотензиновый компонент РААС рассматривают шире, чем это было в классическом представлении. В силу того, что секрецию ангиотензина



**Рис 2.5.2** Биологически активные продукты расщепления ангиотензина-I и рецепторы к ним. С изменениями по [Fyhrquist, Saijonmaa, 2008]

и ренина нашли в различных органах и тканях, то теперь эти гормоны объединяют в паракринные ренин-ангиотензиновые системы (РАС).

В исходном представлении о РААС активным является АТ-II. Его эффекты опосредованы связыванием с рецепторами AT1R и AT2R [Benigni, Cassis, Remuzzi, 2010]. Вазоконстрикторные эффекты, индукция пролиферации и тромбообразования, генерация свободных радикалов через активацию НАДН-оксидазы – все эти эффекты опосредованы AT1R, который является преобладающим типом рецептора для АТ-II [Hunyady, Catt, 2006]. Взаимодействие АТ-II с AT2R приводит к противоположенным эффектам – вазодилатации, генерации оксида азота и ингибированию пролиферации [Porrello, Delbridge, Thomas, 2009, с. 2]. Этот рецептор активно экспрессируется в тканях плода во время внутриутробного развития, однако после рождения его экспрессия снижается и остаётся низкой во взрослых тканях и органах, включая надпочечники и сосудистый эндотелий [Steckelings, Kaschina, Unger, 2005]. AT2R также способны активироваться при связывании с АТ 1-7, индуцируя вазодилатацию [Vilella и др., 2015]. В тоже время основным эндогенным лигандом для них идентифицирован АТ 1-9.

К настоящему моменту идентифицированы и другие пептиды, появляющиеся в результате расщепления АТ-I и АТ-II, которые обладают гормональной активностью, а также пептидазы, которые их делают. Описаны рецепторы к ним и их основные эффекты. В дополнение к классическому пути генерации АТ-II посредством АПФ, выявлено что это превращение производится ферментом секреторных гранул тучных клеток – химазой, которая находится там в комплексе с гепарином и высвобождается при повреждении сосудистой стенки [Takai и др., 2004]. Из АТ-II (1-8) при помощи аминопептидазы А (АМРА) производится ангиотензин-III (2-8) (АТ-III), который связывается с теми же рецепторами, что и АТ-II (рис. 2.5.2). АТ-III играет важную роль в центральной регуляции сосудистого тонуса, принимая участие в стимуляции выброса вазопрессина [Zini и др., 1996]. АТ-III (2-8) расщепляется аминопептидазой М (АМРМ) до АТ-IV (3-8). Для этого пептида идентифицированы инсулин-регулируемые аминопептидазные рецепторы (IPAR). Для IPAR-рецепторов описаны эффекты почечной дилатации, гипертрофии и производства провоспалительных цитокинов [Chai и др., 2004].

В отдельную ветвь ренин-ангиотензиновой системы выделяют АПФ2, который конвертирует АТ-I (1-10) в ангиотензин (1-9), а АТ-II (1-8) в ангиотензин (1-7) [Fyhrquist, Saijonmaa, 2008]. Экспрессия АПФ2 повышена в сосудистой эндотелии почек, сердца и стенке аорты [Santos, Ferreira, 2007]. Для ангиотензина (1-7) в 2003 году был идентифицирован Mas-рецептор [Santos и др., 2003]. Связывание ангиотензина (1-7) с Mas-рецептором опосредует разнообразные эффекты, противостоящие таковым для АТ1R, - антитромботические и антиаритмогенные эффекты, вазодилатация и ингибирование роста клеток [Simões e Silva и др., 2013]. В то же время, для Mas-рецептора недавно была показана возможность стимуляции нейропептидом FF, аламандином, АТ-III и АТ-IV.

К настоящему моменту появились работы, демонстрирующие значение этой ветви ренин-ангиотензиновой системы в предотвращении АТ-II опосредованной сердечной недостаточности [Oudit и др., 2007] и облегчении острого респираторного дистресс-синдрома [Wösten-van Asperen и др., 2011].

### II.5.2.1 Ангиотензин. Основные рецепторы. AT1R

Основным рецептором, опосредующим эффекты ангиотензина-II, является AT1R. Это семидоменный G-белок-связанный рецептор, экспрессирующийся клетками эндотелия, ГМК сосудов, кардиомиоцитами, адипоцитами, а также в мозге, почках и надпочечниках [Gasparo de и др., 2000]. При связывании с лигандом происходит скоротечно проходящая активация AT1R, которая заканчивается интернализацией рецептора. От G-белка AT1R диссоциирует в течение 10с [Paek и др., 2017]. Сигналлинг происходит как через G-белки, так и через  $\beta$ -аррестин, что сопровождается интернализацией рецептора.

AT1R взаимодействует с Gq/11, G12/13, and Gi – белками [Forrester и др., 2018]. Вторичными мессенджерами являются инозитол-3-фосфат (IP3), диацилглицерол (ДАГ), арахидоновая кислота и АФК, которые проводят сигнал дальше, а также активируют фосфолипазы А, С и D. В сосудистых ГМК G-белковый сигналлинг от AT1R регулирует тонус через Gq/11  $Ca^{2+}$ -зависимую активацию киназы лёгких цепей миозина (MLCK) и G12/13-опосредованное ингибирование фосфатазы лёгких цепей миозина (MLCP) с помощью Rho-киназы.

Проведение сигнала от AT1R сопровождается активацией большого числа серин/треониновых киназ, а также тирозиновых киназ, среди которых есть рецепторные и нерцепторные (рис. 2.5.3). Рецепторные тирозинкиназы большей частью относятся к

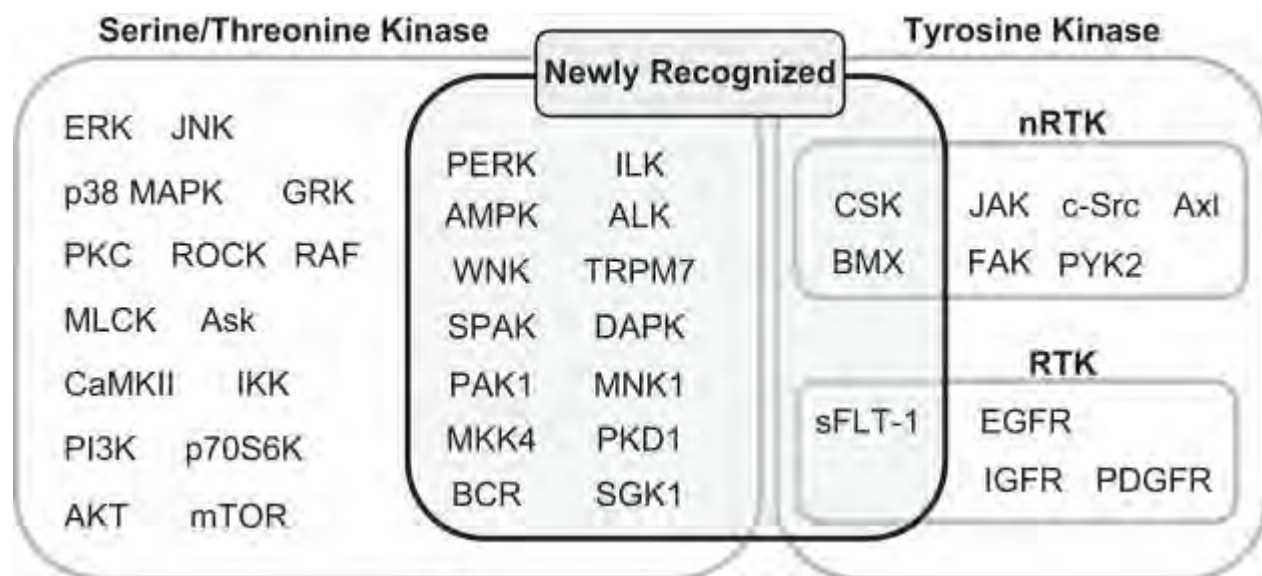


Рис 2.5.3. Киназы, активируемые в результате проведения сигнала от AT1R

рецепторам факторов роста, а их активация, опосредованная проведением сигнала от AT1R, называется трансактивацией. Проведение сигнала через AT1R трансактивирует рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR), инсулин-подобного фактора роста (IGFR) и тромбоцитарного фактора роста (PDGFR) (рис. 2.5.3).

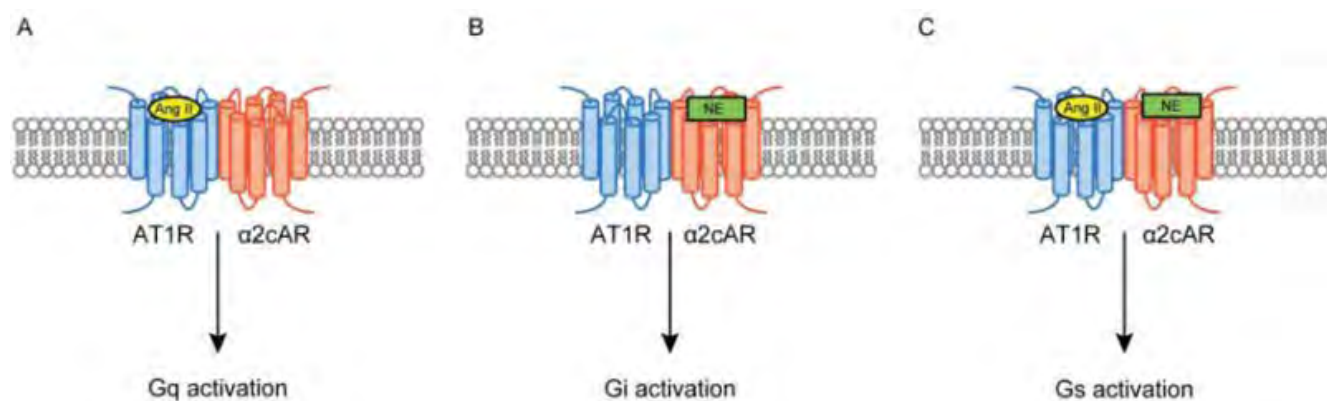
После связывания с лигандом AT1R обычно фосфорилируется G-белок киназой (GRK) по сериновым и треониновым остаткам с COOH-конца [Turu, Balla, Hunyady, 2019]. Фосфорилирование AT1R по этим остаткам ведёт к соединению с  $\beta$ -аррестином, что ведёт прекращению G-белкового сигналинга и к дальнейшей интернализации рецептора [DeWine и др., 2007].  $\beta$ -аррестины – это структурные скаффолд-белки, которые опосредуют десенситизацию и интернализацию G-белковых рецепторов (GPCR). GPCR в свою очередь разделяются по аффинности связывания с членами семейства  $\beta$ -аррестинов на два класса – А и В. GPCR класса А из всех  $\beta$ -аррестинов взаимодействуют только с  $\beta$ -аррестином-2, тогда как GPCR класса В взаимодействуют со всеми членами семейства  $\beta$ -аррестинов [Turu, Balla, Hunyady, 2019]. К GPCR класса А относятся эндотелиновый рецептор типа А (ET<sub>A</sub>),  $\beta_2$ - и  $\alpha_{1A}$ -адренорецепторы, к GPCR класса В относятся AT1R<sub>A</sub>, рецептор к нейротензину 1, рецептор к вазопрессину V2, рецептор к субстанции Р [DeWine и др., 2007, с. 2]. Сигналинг через  $\beta$ -аррестины включает активацию тирозинкиназ ERK 1/2, JNK, Akt, p38 и MAPK-каскада. Для сердечно-сосудистой системы помимо прямых эффектов на усиление пролиферации выделяют несколько окончательных эффектов проведения сигнала через  $\beta$ -аррестины. Так, например, показано увеличение синтеза альдостерона в кортикальной зоне надпочечников гломерулёзными клетками, что может вести к сердечной недостаточности [Lymperopoulos и др., 2009].

Для ГМК сосудов преимущественную роль играет G-белковый путь передачи сигнала и трансактивация EGFR с последующей активацией Rho-киназы. Тем не менее, показано участие  $\beta$ -аррестина 2 и в трансактивации EGFR и в активации Rho-киназы [Barnes и др., 2005; Seta, Sadoshima, 2003]. Продолжительный сигналинг именно через AT1R приводит к «фенотипическому переключению» ГМК сосудов за счёт индукции экспрессии TRPM7-каналов с помощью ERK 1/2 [Zhang и др., 2012b].

AT-II провоцирует гипертрофию миокарда через MAPK-каскад [De Mello, Danser, 2000], а также посредством стимуляции экспрессии KLF5 и дальнейшего связывания KLF5 с ядерными рецепторами ретиноевой кислоты – RAR [Nagai и др., 2003]. В кардиомиоцитах AT1R и  $\beta$ -аррестины вовлечены в регуляцию Ca<sup>2+</sup>-чувствительности сократительных миофиламентов и, таким образом, в регуляцию сократимости сердца и в реализацию закона Франка-Старлинга [Abraham и др., 2016]. Также AT1R могут активироваться в отсутствие лиганда просто за счёт механического растяжения плазмалеммы и проводить сигнал через  $\beta$ -аррестины с сопутствующей EGFR-трансактивацией – это обуславливает выживание кардиомиоцитов [Rakesh и др., ]. Для ангиотензиновых рецепторов идентифицированы лиганды, которые могут активировать проведение сигнала через  $\beta$ -аррестины, не задействуя

при этом G-белковый путь проведения сигнала, так, например, для AT1R таким лигандом является AT 1-7 [Teixeira и др., 2017].

AT1R, наряду с прочими GPCR образует димеры с другими G-белковыми рецепторами. Известны димеры AT1R с рецепторами брадикинина B2, рецептора к хемокинам CCR2, дофаминового рецептора D1, простогландинового рецептора F, пуринергического рецептора P2Y6, а также эндотелинового рецептора - ET<sub>B</sub>,  $\beta$ <sub>1-2</sub>-,  $\alpha$ <sub>1D</sub>- и  $\alpha$ <sub>2C</sub>-адренорецепторов [Forrester и др., 2018]. AT1R образует димеры и с другими рецепторами к ангиотензиновым пептидам – AT2R (AT-II) и Mas (AT 1-7). Димеризация может приводить к изменению характера



**Рисунок 2.5.4.** Влияние димеризации AT1R на проведение сигнала в зависимости от связывания с разными лигандами. По [Takezako и др., 2017] с изменениями.

проведения сигнала. Так, например, для димера AT1R с  $\alpha$ <sub>2C</sub>-адренорецептором будут активироваться три различных G-белка для всех трёх возможных вариантов активации димера (рис. 2.5.4) [Takezako и др., 2017]. Для значительной части димеров установлено изменение сигнала от AT1R при димеризации. Так, например, димеризация AT1R с AT2R, ET<sub>B</sub>- и Mas-рецептором ингибирует проведение сигнала от AT1R, тогда как димеризация с  $\beta$ <sub>1</sub>- и  $\beta$ <sub>2</sub>-адренорецепторами, брадикининовым рецептором B2, рецептором к простогландину A и P2Y-рецептором считается усиливающей проведение сигнала от AT1R [Forrester и др., 2018].

AT1R напрямую взаимодействует с кальмодулином через сайты на COOH-конце и третьей внутриклеточную петлю, при этом кальмодулин конкурирует с G $\beta\gamma$ -субъединицей [Zhang и др., 2013a]. Через цитоплазматические домены на COOH-конце AT1R также взаимодействует с фосфолипазой C (PLC $\gamma$ 1) [Venema и др., 1998], а также компонентами цитоскелета – тубулином и филамином A [Tirupula и др., 2015; Zhang и др., 2013b]. Отдельно нужно отметить взаимодействие AT1R с AT1R-ассоциированными белками ATRAP и ARAP1. ATRAP, связываясь с AT1R, подавляет проведение сигнала и опосредует интернализацию рецептора, тогда как ARAP1 опосредует возвращение рецептора на цитоплазматическую мембрану.

### II.5.2.2 Ангиотензин. Основные рецепторы. AT2R

AT2R, как принято считать, оказывает противовоспалительные и антипролиферационные эффекты [Forrester и др., 2018]. Также он оказывает сосудорасширяющее действие, активируя PKA-зависимую eNOS, и с помощью паракринного сигналинга через брадикинин-активируемую цГМФ-зависимую NO-продукцию [Padia, Carey, 2013]. Однако, документированы и противоположенные эффекты – у спонтанно-гипертензивных крыс (SHR) зарегистрирована AT2R-опосредованная вазоконстрикция [You и др., 2005].

AT2R, как и AT1R, обладает способностью к гомо- и гетеродимеризации [Rukavina Mikusic и др., 2020]. Образование гетеродимера AT2R с AT1R тормозит проведение сигнала от AT1R при стимуляции ангиотензином-II. При этом интернализация AT2R происходит только в составе гетеродимера с AT1R, причём для образования комплекса необходимо AT1R-зависимое фосфорилирование AT2R протеинкиназой C (PKC) [Inuzuka и др., 2016]. До интернализации AT2R проводит сигнал. Интернализация димера AT1R-AT2R сопровождается транслокацией на ядерную мембрану (рис. 2.5.7) [Rukavina Mikusic и др., 2020].

На данный момент остаётся неизвестным механизм проведения сигнала от AT2R. Это GPCR-рецептор имеет такую структуру, при которой связывание с G-белками и  $\beta$ -аррестинами стерически затруднено из-за положения VIII внутриклеточной спирали [Zhang и др., 2017]. В то же время допускается, что в мембранно-связанном состоянии VIII спираль может менять своё положение и связываться с эффекторами. Последние исследования структуры AT2R установили, что С-концевая часть рецептора совместима с сигналингом через стандартные G-белковые эффектора и идентифицировали первую внутриклеточную петлю, как важный модификатор положения спирали VIII [Connolly и др., 2019].

### II.5.2.3 Ангиотензин. Интракринная PAC

Ключевые элементы синтеза АТ-II и проведения сигнала обнаруживаются внутри клетки в своём функциональном виде, поэтому ряд исследователей выделяют их во внутриклеточную интракринную PAC (рис. 2.5.5). Рецепторы к ангиотензину (AT1R, AT2R и Mas) находят на мембранах внутриклеточных органелл. В настоящее время идёт активное изучение роли этих рецепторов в работе клеточных структур.

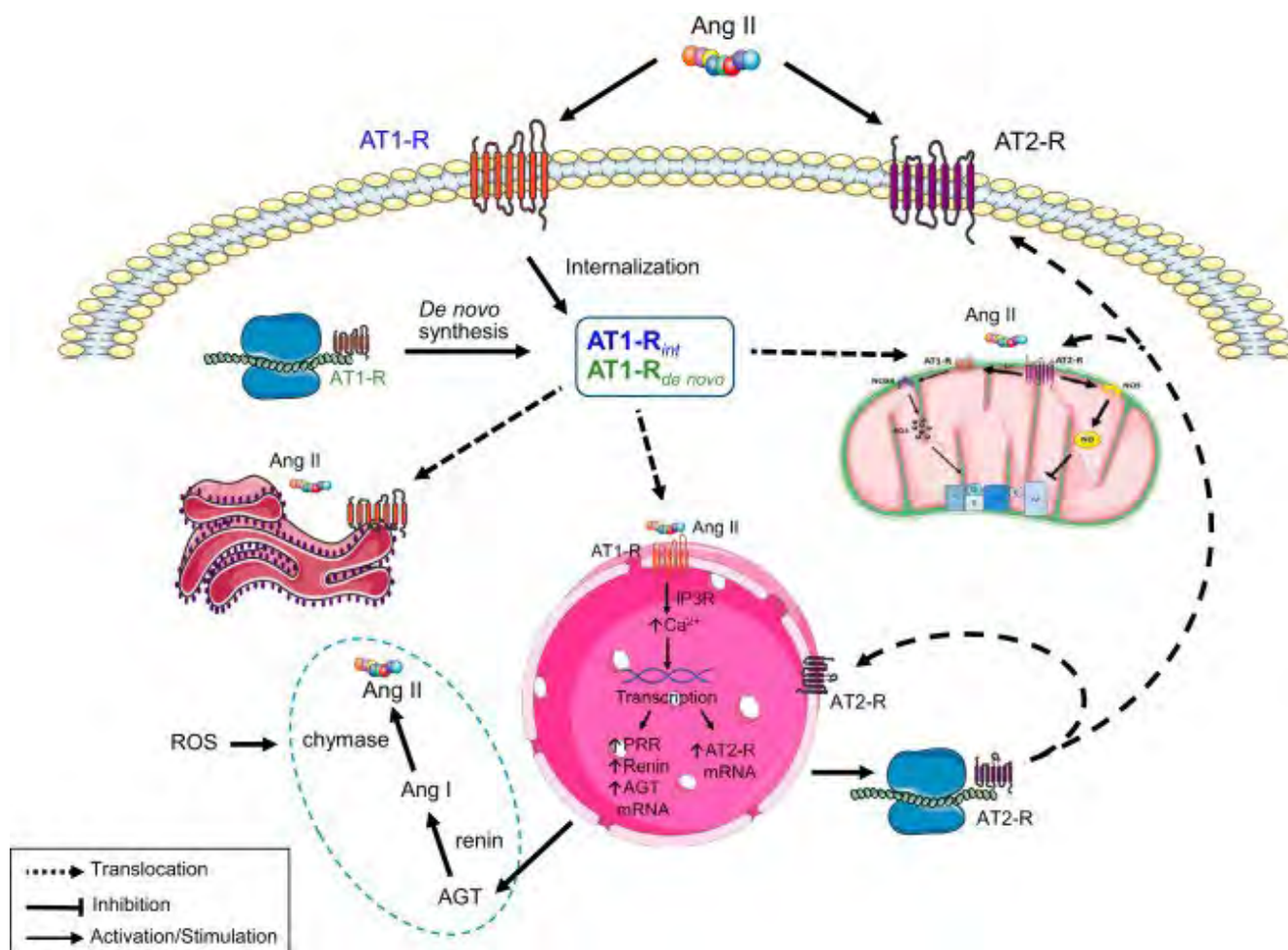


Рис 2.5.5. Основные элементы внутриклеточной PAC

В последнее десятилетие появилось много работ о внутриклеточной локализации и сигнализации G-белковых рецепторов, которые привели к пересмотру традиционного взгляда на сигналинг через G-белковые рецепторы, до этого представлявшийся, как проведение сигнала от активированного лигандом рецептора с плазмалеммы внутрь клетки. G-белковые рецепторы, которые находили внутри клетки, рассматривались в качестве созревающих для отправки на плазмалемму. На данный момент различные функциональные G-белковые рецепторы нашли на мембранах практически всех клеточных органелл, имеющих мембрану, – ядра, митохондрий, ЭПР/СПР, аппарата Гольджи и эндосом. На

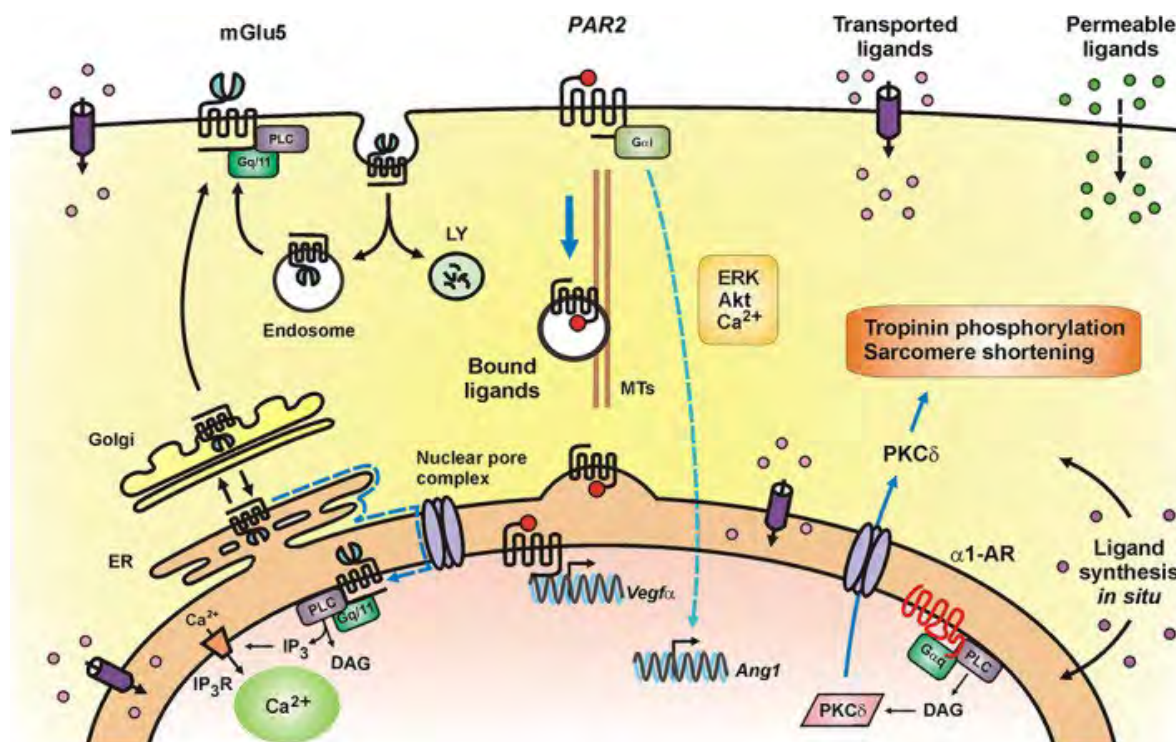
ядерной мембране найдено свыше 30 G-белковых рецепторов [Jong, Harmon, O'Malley, 2018a].

В клеточном ядре G-белковые рецепторы находят на внешней и внутренней мембране (AT1R, ET<sub>B</sub>-рецептор, PAR2), а также в растворённом виде в нуклеоплазме (APJ-рецептор, окситоциновый и CXC4-рецепторы) [Jong, Harmon, O'Malley, 2018b]. Внутри ядра рецепторы попадают разными способами. Ряд рецепторов (AT1R, брадикининовый рецептор B2, аденозиновый рецептор A2, APJ-рецептор к апелину, α-адренорецепторы) обладает специальной NLS-последовательностью (nuclear localization signal), которая распознаётся белками ядерного импорта из семейства кариоферинов. Другие рецепторы (PAR2, окситоциновые и вазопрессиновые рецепторы) имеют несколько NLS-последовательностей. PAR2 после взаимодействия с лигандом интернализуется и распознаётся импортином-1, затем транспортируется к ядру с помощью динеинового транспорта вдоль микротрубочек, сортируясь при взаимодействии с нексином-11. Окситоциновые и вазопрессиновые рецепторы после активации подвергаются интернализации, опосредованной β-аррестинами, затем взаимодействуют с транспортин-1 и кариоферинами и транспортируются в ядро. Есть рецепторы, лишённые NLS-последовательности (PAF-рецептор), которые попадают в ядро, взаимодействуя с малыми RAS-ГТФазами, а также с Rab11a и импортином-5 [Jong, Harmon, O'Malley, 2018a]. Таким образом, не существует единого механизма доставки рецепторов в ядро. Также не всегда на нуклеоплазму доставляются уже активированные рецепторы с клеточной мембраны. Часть рецепторов попадают на нуклеоплазму сразу после своего синтеза путём ограниченной диффузии с мембран СПР (рис. 2.4.5) [Katta, Smoyer, Jaspersen, 2014].

Транслокация активированных рецепторов с плазмалеммы в ядро, как правило, производится через ретикулум и комплекс Гольджи. К настоящему моменту известно два рецептора, который транслоцируется с плазмалеммы прямо на ядерную мембрану – эндотелиновый рецептор – PAR2 в ганглиозных клетках сетчатки и ET<sub>B</sub> [Merlen и др., 2013].

В нуклеоплазме обнаружены основные участники передачи сигнала от G-белковых рецепторов – мономерные (Ras, Rab, Rho и Ran) и гетеротримерные (Gi, Gs, Gq, G11, G12, G13 и G16) G-белки, аденилатциклаза (AC), β-аррестины, фосфолипазы A<sub>2</sub>, C и D, фосфодиэстераза, киназы (PI3K, PKC, PKA, различные GRK), ионные каналы – IP3-рецепторы и рианодиновые рецепторы, а также НАДН-оксидазы [Jong, Harmon, O'Malley, 2018a]. На наружной мембране ядра обнаружены Ca<sup>2+</sup>-АТФазы, которые закачивают в люминальное пространство между внутренней и наружной ядерной мембраной Ca<sup>2+</sup>. Проведение сигнала через рецепторы происходит по стандартному для G-белковых рецепторов пути проведения сигнала, т.е. с повышением концентрации вторичных

мессенджеров (цАМФ, АФК,  $Ca^{2+}$ ) в нуклеоплазме. Однако, для некоторых рецепторов, например для PAR2, установлены различные эффекты при его активации на плазмалемме и



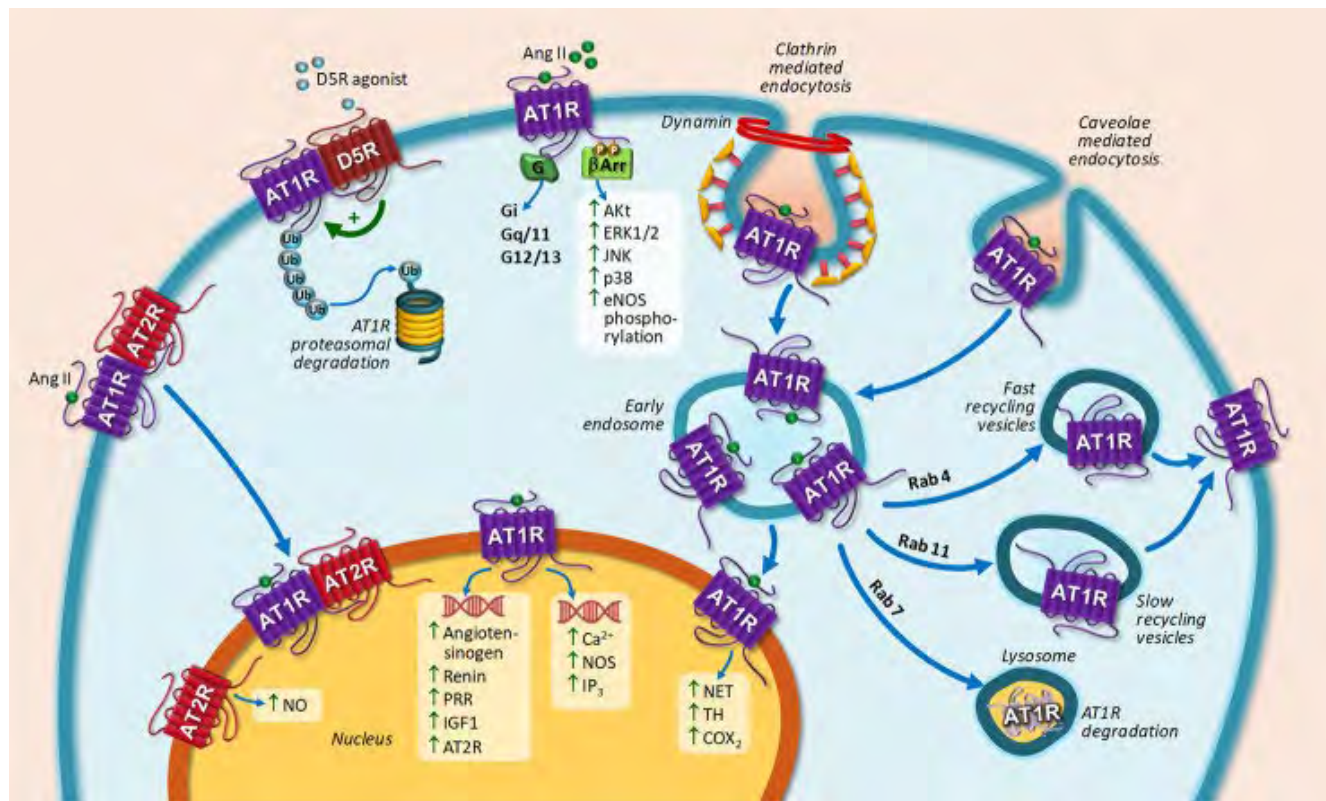
**Рис 2.5.6.** Транслокация G-белковых рецепторов на ядерную мембрану и проведение сигнала. С изменениями по [Jong, Harmon, O'Malley, 2018a]

на ядерной мембране. Так при активации PAR2 на плазмалемме активируется синтез ангиопоетина-1, тогда как при активации того же рецептора на ядерной мембране запускается синтез VEGF (рис. 2.5.6) [K Bhosle и др., 2016].

В митохондриях найдены пуриновые (P2Y) рецепторы, ангиотензиновые рецепторы (AT1R и AT2R), мелатониновые и каннабиноидные рецепторы [Jong, Harmon, O'Malley, 2018a]. Они могут влиять на продукцию АТФ и АФК, захват митохондриями  $Ca^{2+}$  и на апоптоз.

Рецепторы к ангиотензину и его производным обнаруживаются на мембранах ядра, митохондрий и саркоплазматического ретикулума в кардиомиоцитах, ГМК, дофаминэргических нейронах и ряда других клеток [Escobales, Nuñez, Javadov, 2019; Labandeira-Garcia и др., 2020]. На сегодня не выработано общих взглядов на функции внутриклеточной РАС. В то же время, принимая во внимание то, что известно про эту систему на данный момент, группа Labandeira-Garcia предлагает считать, что внутриклеточная РАС служит своеобразным буфером, «абсорбирующим» избыток экстраклеточного АТ-II. Показана ядерная локализация AT1R, AT2R и Mas рецепторов, а также АТ-II и АТ 1-7 для дофаминэргических нейронов [Villar-Cheda и др., 2017]. Этими же исследователями показана транслокация АТ-II в ядро.

В изолированных ядрах кардиомицитов стимуляция AT1R и AT2R приводит к увеличению экспрессии NF-κB [Tadevosyan и др., 2010]. При этом стимуляция AT1R приводит к внутриядерному подъёму  $Ca^{2+}$ , опосредованному IP3-рецепторами, а стимуляция AT2R – нет (рис. 2.5.6). Стимуляция ядерного AT2R приводит к синтезу NO [Rukavina Mikusic и др., 2020].



**Рис 2.5.7.** Основные внутриядерные эффекты AT-II рецепторов и их траффик. По [Rukavina Mikusic и др., 2020] с изменениями.

Стимуляция AT1R в ядрах ГМК, фибробластов, мезангиальных клетках, клетках коркового слоя почек ведёт к выбросу внутри ядра  $Ca^{2+}$  и изменению экспрессии ряда генов (рис. 2.5.7) [Bkaily и др., 2003; Silva Novaes da и др., 2018, с. 2; Tadevosyan и др., 2017].

### II.5.3. Ангиотензин-II и НАДФН-оксидаза

Один из важных эффектов регуляторных эффектов на деятельность ГМК ангиотензина-II заключается в активации НАДФН-оксидазы. НАДФН-оксидаза – уникальный фермент, единственной установленной к настоящему моменту функцией которого является генерация перекиси водорода и активных форм кислорода [Kato, Hecker, 2020]. Активация НАДФН-оксидазы ведёт к изменению клеточного свободнорадикального фона, который влияет на активность многих протекающих в клетке процессов.

НАДФН-оксидаза – это мультикомпонентный комплекс, состоящий из двух мембранных субъединиц - gp91phox (в настоящее время чаще обозначаемого NOX-2) и p22phox, а также из цитоплазматических субъединиц - p47phox, p67phox, p40phox и Rac1 или Rac2 [Santillo и др., 2015]. После стимуляции цитоплазматические субъединицы транслоцируются на поверхность, активируя фермент.

У млекопитающих выделяют 7 генов НАДФН-оксидаз - NOX1 - 5 и DUOX1,2 [Lambeth, 2004]. Все члены этого суперсемейства имеют на С-конце флавопротеиновый домен, который содержит участки для связывания НАДФН и ФАД [Kato, Hecker, 2020]. NOX1-4 ассоциированы с p22phox. Активность NOX4, NOX5, DUOX 1, 2 не модулируется цитоплазматическими субъединицами. В ГМК резистивных артерий экспрессируется главным образом NOX2, которая при этом слабо экспрессируется в ГМК крупных сосудов [Lassègue, Clempus, 2003]. Тогда как в ГМК крупных сосудов повышена экспрессия NOX1 и NOX4, которые локализованы в разных клеточных компартментах [Hilenski и др., 2004]. NOX2,4 – наиболее экспрессируемые кардиомиоцитами изоформы [Santillo и др., 2015]. NOX2 локализована на плазмалемме и модулируется натяжением и АТ-II, NOX4 локализована во внутриклеточных компартментах и конститутивно активна.

Все сосудистые НАДФН-оксидазы, включая NOX1, NOX2, NOX4 и NOX5 регулируются АТ-II [Nguyen Dinh Cat и др., 2013]. Регуляция происходит, как на уровне экспрессии – за счёт активации АТ-II экспрессии соответствующих генов [Forrester и др., 2018], так и за счёт активации транслокации p47phox в кавеолы [Soe и др., 2013].

NOX1 – это первый идентифицированный гомолог NOX2 с наибольшей экспрессией в кишечнике [Suh и др., 1999]. Этот фермент изначально был охарактеризован в качестве участника врождённого иммунного ответа [Lassègue, Clempus, 2003]. В этой же роли он может выступать и в лёгких [Kato, Hecker, 2020]. Экспрессия этого фермента увеличивается в различных условиях, в т.ч. при ЛАГ [Ghouleh и др., 2017]. Конститутивно-активная NOX1 включает в себя также трансмембранную субъединицу p22phox, цитоплазматические организационную субъединицу NoxO1 (гомолог p47phox), активирующую субъединицу NoxA1 (гомолог p67phox) и Rac1 [Kato, Hecker, 2020].

NOX2 (также известный, как gp91phox) – это первая изученная НАДФН-оксидаза. Она сильнее всего экспрессируется в фагоцитах. В меньшем количестве экспрессируется в мезенхимальных, эпителиальных, эндотелиальных и гладкомышечных клетках лёгких [Harijith, Natarajan, Fu, 2017]. NOX2 образует неактивный димер с трансмембранной субъединицей p22phox. Активация происходит посредством транслокации и объединения с четырьмя цитозольными субъединицами p47phox (организующая), p67phox, p40phox и Rac1 или Rac2 [El-Benna и др., 2009].

NOX4 экспрессируется в лёгких в различных типах клеток, как в иммунных, так и в структурных [Kato, Necker, 2020]. NOX4 – конститутивно активная НАДФН-оксидаза, которая не нуждается в адаптерных цитоплазматических белках, однако образование гетеродимера с p22phox усиливает генерацию АФК [Ambasta и др., 2004]. В сосудистых ГМК димеры NOX4/p22phox ассоциируются с Poldip2 (полимеразой-дельта взаимодействующим белком), что дополнительно усиливает генерацию АФК, а также влияет на Rho-зависимую цитоскелетную реорганизацию и клеточную миграцию [Lyle и др., 2009, с. 2]. NOX4 – единственная НАДФН-оксидаза, экспрессия которой индуцируется TGF- $\beta$ 1 и увеличивается при идиопатическом лёгочном фиброзе [Necker и др., 2009, с. 4]. Индукция экспрессии NOX4 происходит через SMAD3-зависимый механизм. TGF- $\beta$ 1-зависимая генерация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> NOX4 является определяющим фактором в дифференцировке лёгочных мезенхимальных клеток в миофибробласты и опосредует увеличение синтеза матриксного коллагена и сократительной активности. [Necker и др., 2009, с. 4]. NOX4 наиболее широко экспрессирующаяся НАДФН-оксидаза в ГМК и эндотелиоцитах человека и грызунов [Knock, 2019]. Она обнаруживается на мембране клеточных органелл, в частности на ядерной мембране и на мембранах саркоплазматического ретикулула эндотелиоцитов и ГМК в виде сплайсингового варианта, потерявшего трансмембранный домен, но функционирующего и ассоциированного с p22phox [Anilkumar Narayana и др., 2013; Knock, 2019]. NOX4 также найдена на митохондриальной мембранах кардиомиоцитов и дофаминергических нейронов [Frazziano и др., 2013; Valenzuela и др., 2016].

NOX5 – НАДФН-оксидаза, которая не требует для активации цитоплазматических субъединиц. Регуляция активности фермента достигается за счёт изменений концентрации внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> и различных посттрансляционных модификаций [Toouy и др., 2019, с. 5]. Фосфорилирование NOX5 усиливает чувствительность к Ca<sup>2+</sup> [Jha и др., 2017]. Окисление цистеиновых и метиониновых остатков фермента наоборот приводит к уменьшению чувствительности к Ca<sup>2+</sup>, что по всей видимости служит защитным механизмом от гиперактивации фермента [Petrushanko и др., 2016]. Нитрозилирование и сумоилирование приводит к уменьшению активности NOX5. В отличие от остальных НАДФН-оксидаз,

которые локализованы на клеточной мембране, NOX5 локализована в перинуклеарном пространстве и на мембране ЭПР [Ahmarani и др., 2013]. Таким образом ЭПР может выступать в качестве региона, в котором взаимодействуют  $Ca^{2+}$ - и АФК-сигнальные пути [Montezano и др., 2018]. Ангиотензин-II является одним из наиболее изученных регуляторов NOX5, повышающих её экспрессию и активность [Montezano и др., 2015]. Ген NOX5 отсутствует у грызунов.

DUOX1,2 – НАДФН-оксидазы, интенсивно экспрессирующиеся в лёгочном эпителии и участвующие во врождённом иммунном ответе. Эти НАДФН-оксидазы конститутивно активны и генерируют АФК в экстраклеточное пространство, закачивая в цитоплазму протоны. DUOX состоит из gp91phox-гомологичного домена, внутриклеточной EF-петли, образующей  $Ca^{2+}$ -связывающие сайты, и экстраклеточного домена, отсутствующего в других НАДФН-оксидазах [Fischer, 2009]. Для появления DUOX1,2 на плазмалемме необходимы факторы созревания DUOXA1,2. Эти факторы участвуют в транслокации из ЭПР в аппарат Гольджи, а также найдены образующими комплексы с DUOX1,2 на плазматической мембране [Grasberger, Refetoff, 2006]. Внутриклеточная концентрация  $Ca^{2+}$  регулирует активность DUOX двумя способами: во-первых без связывания с кальцием  $Ca^{2+}$ -связывающих сайтов не происходит генерации АФК, а во-вторых для DUOX1 характерно  $Ca^{2+}$ -зависимое связывание с цитоплазматической субъединицей NOXA1, ингибирующее DUOX1 [Pacquelet и др., 2008].

## **II.6. Гипоксическая вазоконстрикция – нервонезависимый механизм регуляции сосудистого тонуса лёгочных артерий**

### **II.6.1. Гипоксическая вазоконстрикция (ГВР). Физиологическое значение**

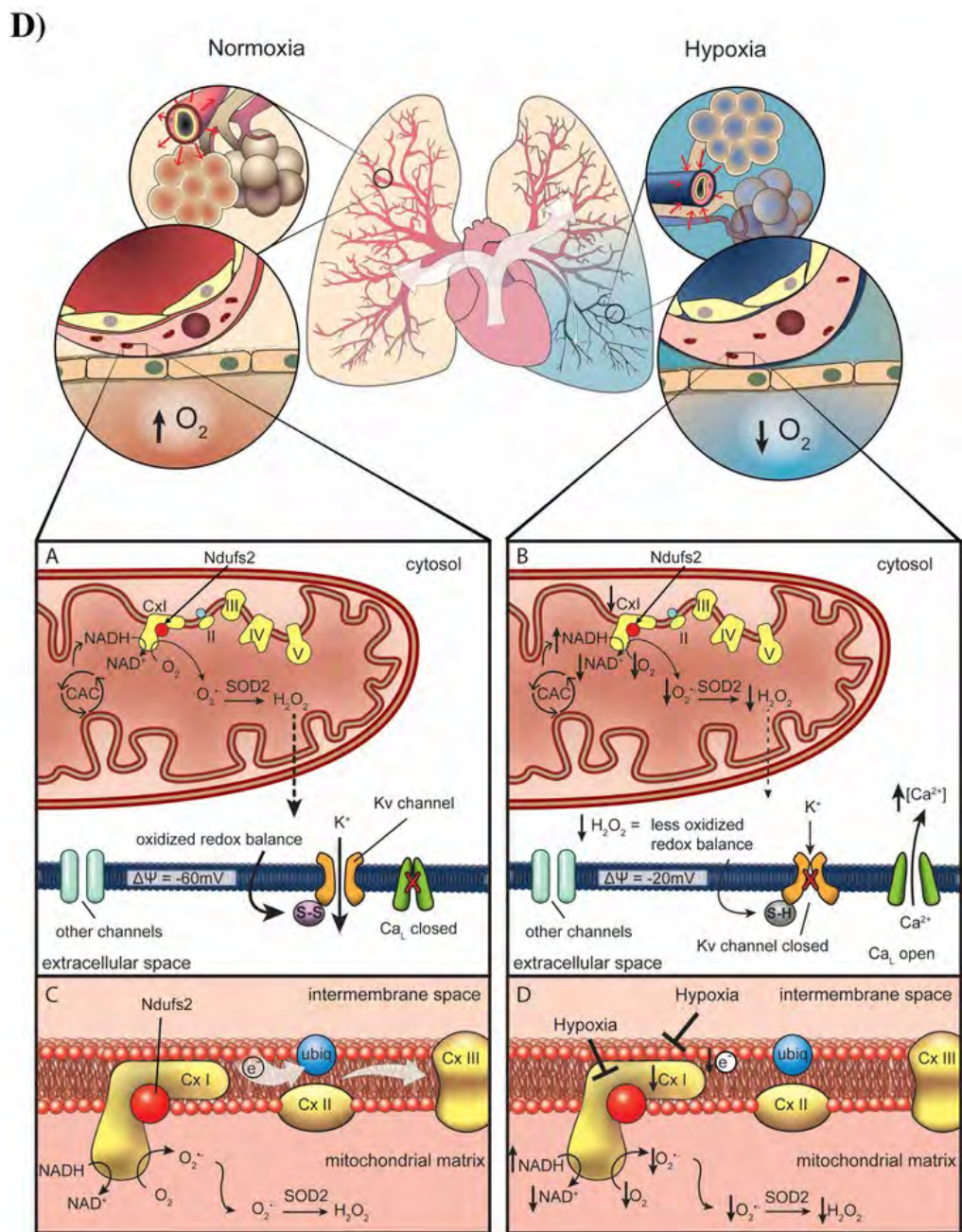
Гипоксическая вазоконстрикция является отличительной особенностью сосудов малого круга кровообращения, в то время как для резистивных сосудов большого круга кровообращения (почечных, кишечных, мозговых артерий) характерной реакцией на гипоксию является дилатация [Dunham-Snary и др., 2017]. Эти сосудистые реакции направлены на оптимизацию доставки кислорода к тканям. В случае системных артерий это достигается за счёт увеличения перфузии (в соответствии с уравнением Пуазейля поток через сосуд обратно пропорционален радиусу сосуда, взятому в четвёртой степени). В случае лёгочных артерий констрикция служит для оптимизации насыщения крови кислородом и освобождения её от углекислого газа, минимизируя проток через слабовентилируемые регионы лёгких, т.е. шунт, поддерживая таким образом соответствие между процессами лёгочной вентиляции и перфузии [Medvedeva, Pankova, Artemieva, 2017]. Вентиляционно-перфузионные отношения являются одним из ключевых понятий в физиологии дыхания, с помощью которых описываются процессы газообмена в лёгких [Boron, Boulpaep, 2012]. Несоответствия между процессами вентиляции и перфузии, при которых происходит перфузия слабовентилируемых сегментов лёгких, либо же наоборот происходит вентиляция слабоперфузируемых сегментов лёгких приводит к гипоксемии и гиперкапнии. Это состояния, которые часто встречаются при хронических обструктивных лёгочных заболеваниях (ХОБЛ), остром респираторном дистресс-синдроме и тромбоэмболии лёгочных артерий [Petersson, Glenny, 2014].

### **II.6.2. Гипоксическая вазоконстрикция (ГВР). Механизм**

В 1986 г. Moudgil et al была предложена редокс-гипотеза гипоксической вазоконстрикции. Согласно этой гипотезе, ключевыми участниками этого процесса выступают митохондрии, K<sub>v</sub>- и Ca<sub>L</sub>-каналы, а также активные формы кислорода (АФК) в качестве медиатора, образуя т.н. кислород-поддерживающую единицу. При нормоксии базальный уровень АФК выступает в качестве вазодилатирующего стимула. Во время гипоксии уровень АФК снижается, что приводит к ингибированию K<sub>v</sub>- и активации Ca<sub>L</sub>-каналов, повышению внутриклеточного кальция и запуску сокращения гладкомышечной клетки [Reeve и др., 1995]. Однако, в этом вопросе существуют определённые разночтения между разными исследовательскими группами: так, ряд исследователей регистрируют не снижение, а рост АФК [Liu и др., 2003], кроме того, некоторые считают сенсором кислорода NADPH-оксидазу [Jones, Thompson, Morice, 2000].

Ответная реакция сосудов малого круга на гипоксию происходит на фоне активации симпатической нервной системы, которая вносит свой вклад в сосудистый тонус среднего диаметра лёгочных артерий (100-300 мкм)[Shirai и др., 2014]. При этом растущая активность симпатической системы ослабляет гипоксическую вазоконстрикцию через  $\beta$ -адренорецепторы [Schwenke и др., 2009]. Однако, основное увеличение сосудистого сопротивления малого круга кровообращения происходит за счёт вазоконстрикции небольших резистивных артерий и артериол (диаметром <100 мкм) по ненервному механизму.

В настоящее время ГВР описывается редокс-гипотезой, согласно которой ключевыми элементами являются митохондрии и калиевые каналы гладкомышечных клеток (ГМК) лёгочных сосудов [Dunham-Snary и др., 2017]. При нормоксии электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) митохондрий генерирует активные формы кислорода (АФК), которые окисляются супероксиддисмутазой-2 (SOD2) до перекиси водорода (рис. 2.6.1 С). Перекись водорода покидает митохондрию и поддерживает окислительный потенциал в клетке, не давая восстановиться дисульфидным мостикам калиевых каналов, не давая им изменить конформацию и перейти в закрытое состояние. Таким образом, через  $K^+$ -каналы постоянно течёт калиевый ток и поддерживает мембранный потенциал ГМК на уровне  $\sim -60$  мВ (рис. 2.6.1 А). При гипоксии ЭТЦ митохондрий останавливается и в цитозоле падает концентрация перекиси водорода (рис. 2.6.1 D), что приводит к сдвигу окислительно-восстановительного потенциала клетки в область значений, при которых происходит восстановление дисульфидных мостиков калиевых каналов до SH-групп и закрытию каналов. Закрытие калиевых каналов ведёт к деполяризации ГМК. При значениях мембранного потенциала  $\sim -20$  мВ открываются  $Ca^{2+}$ -каналы L-типа, в клетку входит кальций и запускает сокращение (рис. 2.6.1 В).



**Рис 1.6.1** Механизм гипоксической вазоконстрикции. По [Dunham-Snary и др., 2019] с изменениями.

Основными калиевыми каналами, принимающими участие в ГВР являются Kv1.5, Kv2.1 и Shaker-каналы [Dunham-Snary и др., 2017]. Ключевым элементом кислородного сенсора является митохондриальный комплекс I ЕТЦ и его коровый железо-серный белок 2 – Ndufs2 [Dunham-Snary и др., 2019].

### III.1 Монокроталиновая модель ЛАГ.

Монокроталиновая (МСТ) модель является одной из старейших, наиболее изученных и широко применяемых экспериментальных моделей легочной артериальной гипертензии (ЛАГ). Впервые описанная Kay et al. [Kay и др., 1971], эта модель воспроизводится путем однократной подкожной или внутривенной инъекции алкалоида пирролизидина — монокроталина, экстрагируемого из семян растения *Crotalaria spectabilis*, лабораторным крысам (обычно линии Sprague-Dawley или Wistar)[Stenmark и др., 2009]. Примечательно, что это открытие было сделано именно с использованием крыс в качестве экспериментальных животных. Кроме того, вскоре стало понятно, что крысы больше, чем прочие виды, подходят для этой модели. Мыши иным способом метаболизируют монокроталин[Nogueira-Ferreira и др., 2015]. Попытки вводить мышам активный метаболит монокроталина – монокроталин пиррол – приводили к развитию острого отёка лёгких на ранних стадиях и к фиброзу лёгких на поздних, но не вызывали устойчивую лёгочную гипертензию [Dumitrascu и др., 2008]. Введение дегидромонокроталина (3 мг/кг) биглям в правое предсердие приводило к развитию умеренной ЛАГ с формированием неоинтимы в течение 8 недель [Gust, Schuster, 2001]. Сам по себе монокроталин не токсичен. Его патологическое действие опосредовано метаболической активацией в печени системой цитохрома P450 (изоферментом CYP3A4) до высокореактивного электрофильного монокроталинового пиррола (МСТП)[Schultze, Roth, 1998]. МСТП обладает коротким периодом полураспада, но достаточной стабильностью, чтобы достичь легочного русла, где он вызывает избирательное повреждение эндотелия легочных артерий[Nogueira-Ferreira и др., 2015]. Первичное повреждение эндотелия запускает массивный воспалительный ответ, инфильтрацию мононуклеарами и высвобождение провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF- $\alpha$ ), что приводит к пролиферации гладкомышечных клеток сосудов[Naeije, Dewachter, 2007]. В течение 3–4 недель после введения препарата у животных развивается тяжелая легочная гипертензия. Гистологически наблюдается выраженная гипертрофия меди легочных артерий и мускуляризация дистальных артериол[Ryan и др., 2015]. Гемодинамические изменения включают значительное повышение давления в легочной артерии и легочного сосудистого сопротивления, что неизбежно ведет к компенсаторной гипертрофии правого желудочка (ПЖ), а затем к его декомпенсации и гибели животного от правожелудочковой недостаточности[Gomez-Arroyo и др., 2012]. Однако, в отличие от другой распространённой модели ЛАГ - гипоксической лёгочной гипертензии, развитие монокроталиновой ЛАГ не сопровождается повышением системного артериального давления, что воспроизводит течение патологии у человека. Главными преимуществами

модели являются техническая простота, низкая стоимость, отсутствие необходимости в гипоксических камерах и высокая воспроизводимость гемодинамического профиля ЛАГ [Bueno-Beti и др., 2018]. Однако модель подвергается критике за несоответствие некоторым аспектам патологии человека. Во-первых, при МСТ-индуцированной ЛАГ редко формируются сложные плексиформные (неинтимальные) поражения, являющиеся гистологическим маркером тяжелой ЛАГ у людей [Carman и др., 2019; Rey, Hess, Clozel, 2009]. Использование собак в монокроталиновой модели даёт более приближенную к человеческой гистологическую картину ЛАГ, однако за счёт возрастающей цены, времени развития патологии и сложности утверждения заявок в этическом комитете [Nogueira-Ferreira и др., 2015]. Во-вторых, модель характеризуется системной токсичностью, включая веноокклюзионную болезнь печени и гломерулонефрит, а также прямым кардиотоксическим действием (миокардит), что осложняет интерпретацию механизмов дисфункции ПЖ [Gomez-Arroyo и др., 2012]. Сравнение с комбинированной моделью Sugen/Нуроxia показывает, что МСТ-модель лучше отражает воспалительный фенотип болезни, но уступает в имитации облитерирующего сосудистого ремоделирования [Corboz и др., 2024].

### **III.2 Монокроталиновая модель ЛАГ. Основные проявления на клеточном и молекулярном уровне.**

При развитии монокроталиновой лёгочной гипертензии происходит гипертрофия эндотелиоцитов с увеличением синтеза ДНК [Nogueira-Ferreira и др., 2015], уменьшением продукции NO и нарастанием эндотелиальной дисфункции [Varshney и др., 2016]. Гипертрофированные эндотелиоциты теряют кавеолин-1, вследствие чего уменьшается экспрессия колокализованных с ним белков [Mathew и др., 2004]. В клетках интимы усиливается экспрессия эндотелина-1 и уменьшается экспрессия рецепторов ET<sub>B</sub> [Tyler и др., 1999]. Изменения в интимае предвращают ремоделирование меди, которое включает в себя гипертрофию и гиперплазию ГМК, увеличение экспрессии клетками меди сурвивина и транспортёров серотонина [Guignabert и др., 2005; McMurtry и др., 2005], а также снижение экспрессии калиевых каналов Kv1.5 и Kv2.1 [Nogueira-Ferreira и др., 2015]. Снижение экспрессии калиевых каналов может способствовать деполяризации ГМК и вазоконстрикции. Токсическое действие МСТР провоцирует апоптоз эндотелиоцитов [Maarman и др., 2013] и формирование устойчивых к апоптозу популяций эндотелиоцитов [Nicolls и др., 2005] и гладкомышечных клеток [Maarman и др., 2013]. Повреждения адвентиции, вызванные МСТР, характеризуются инфильтрацией воспалительных клеток – макрофагов, дендритных и тучных клеток [Maarman и др., 2013], и

увеличенной продукцией белков внеклеточного матрикса – коллагена, эластина, фибронектина и тенасцина[Naeije, Dewachter, 2007].

### **III. Материалы и методы**

#### **III.1 Экспериментальные животные**

В работе было использовано 100 самцов крыс стока Wistar (2-4 мес, 250±30 г) (определение сосудистого тонуса в сосудистом русле БКК в хроническом эксперименте – n = 25, определение параметров барорецепторной функции – n = 27, характеристика показателей левожелудочковой ино- и лузитропии при ЛАГ с помощью PV-катетера – n = 17, определение интенсивности ГВР при ЛАГ в хроническом эксперименте = 6, определение интенсивности ГВР при ЛАГ с помощью PV-катетера – n = 21, РНК-секвенирование – n = 4).

В ходе экспериментов были соблюдены все актуальные требования этических норм работы с лабораторными животными в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (№123, Страсбург, 18 марта 1986 г.). Исследование одобрено этическим комитетом Научно-исследовательского института экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова Национального медицинского исследовательского центра кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России (№ ЛЭС/01.11.23). Перед экспериментами животных содержали в виварии течение 2 недель в стандартных условиях при световом режиме 12:12 с доступом к воде и пище *ad libitum*.

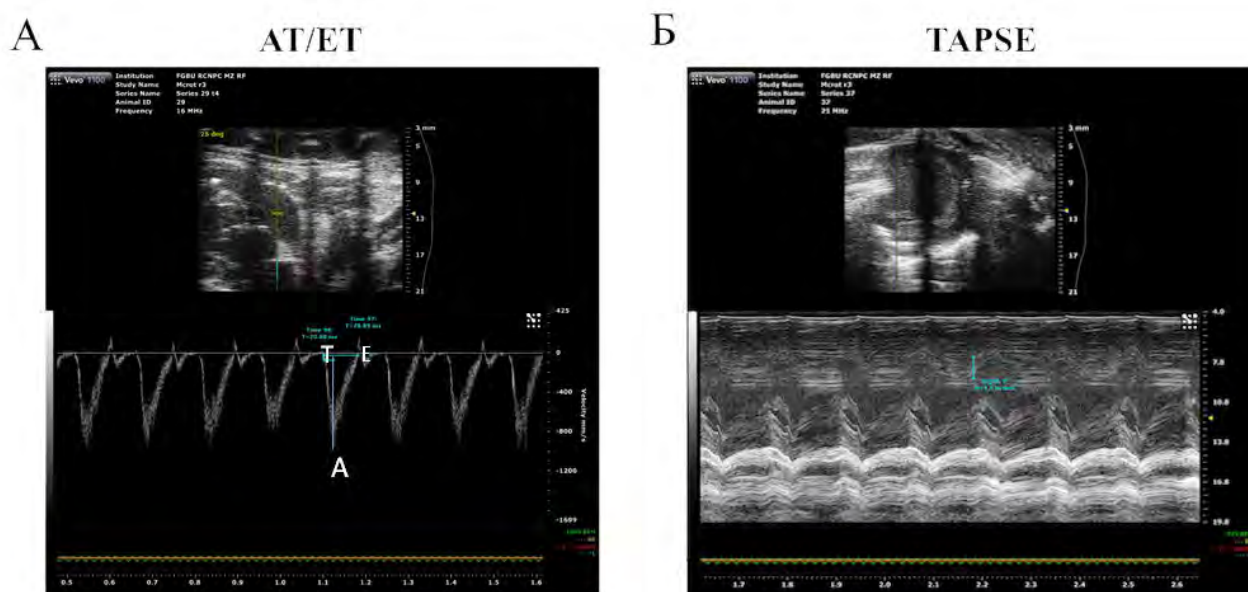
#### **III.2 Индукция ЛАГ и её валидация с помощью ультразвука**

Для индукции ЛАГ использовали стандартный подход[Gomez-Arroyo и др., 2012], основанный на однократном введении монокроталина (МКТ, Sigma Aldrich, подкожно, 60 мг/кг, 0,3 мл). Животным контрольной группы вводили ф. р-р (0,3 мл). В хронических экспериментах ЛАГ индуцировали только у тех животных, которые через 6 сут. после вживления катетеров демонстрировали нормальный уровень среднего артериального давления (100±10 мм рт ст), ЧСС покоя 360±30 уд/мин, ректальную температуру 37±0,5°C, а также суточный объем потребляемой жидкости (30±10 мл).

Формирование экспериментальной ЛАГ верифицировали стандартным способом[Spygouroulos и др., 2020; Zhu и др., 2019] на основе ультразвуковых (УЗИ) признаков гипертрофии правого желудочка (ПЖ) и изменения функциональных показателей правого и левого желудочков (ЛЖ) сердца. УЗИ исследование сердца проводили до инъекции МКТ, а затем на 14-й и 28-й день после введения МКТ (УЗИ аппарат Visual Sonics VEVO 1100 с линейным датчиком MS250, диапазон частот 12-24 МГц). Использовался лево- и правосторонний парастернальный доступ для построения позиций по длинной (1) и короткой (2) оси левого желудочка, по короткой оси на уровне основания сердца (3), по

длинной оси легочного ствола (4). Определяли толщину свободной стенки ПЖ и диаметр легочной артерии.

При УЗИ-доплерографии измеряли в систолу отношение временных интервалов АТ/ЕТ для правого желудочка, как отношение длительности периода ускорения потока (АТ) к длительности фазы изгнания (ЕТ) крови (рис 3.2.1 А). Индекс сократимости ПЖ оценивали (в М-режиме) (рис 3.2.1 Б) по амплитуде систолической экскурсии трикуспидального кольца (TAPSE) стандартным способом. При эхокардиографическом исследовании (ЭХО-КГ) также определяли (В-режим) конечный диастолический и систолический объемы левого желудочка; рассчитывали фракцию выброса (ФВ) и ударный объем (УО) ЛЖ, а также конечно-диастолический (КДО) и конечно-систолический (КСО) объемы.



**Рис 3.2.1** Примеры определения ультразвуковых показателей ЛАГ. **А.** Отношение временных интервалов АТ/ЕТ, **Б.** Индекс сократимости ПЖ (амплитуда систолической экскурсии трикуспидального кольца - TAPSE)

### III.3 Изготовление сосудистых катетеров

Бедренный артериальный катетер (рис. 3.3.1) в нашей работе изготовлялся из полиуретановых и полиэтиленовых трубок и состоял из 3х частей: внутрисосудистая часть имеет длину 4.5 – 5.5 см из ВТРУ-027 (0.4мм×0.7мм 2 Fr), соединительная часть имеет длину 11-13 см из ВТРУ-040 (0.6мм×1мм 3 Fr) и поясок для закрепления на сосуде длиной 1.5-2 мм из РЕ-90 (0.86мм×1.27мм).



**Рис 3.3.1** Полиуретановый артериальный катетер

Поясок натягивается на соединительную часть и протаскивается до места соединения с внутрисосудистой. Чтобы закрутить трубку в спираль, её оборачивают вокруг любого цилиндрического предмета диаметром 0.35-0.4 мм и погружают в кипяток на ~10с, затем быстро вытаскивают и погружают в холодную воду.

Венозный катетер также был выполнен из полиуретана. Сосудистая часть его имеет длину 5-5.5 см из ВТРУ-027 (0.4мм×0.7мм 2 Fr), соединительная часть имеет длину 8-9 см из ВТРУ-040 (0.6мм×1мм 3 Fr) и поясок для закрепления на сосуде длиной 1.5-2 мм из РЕ-90 (0.86мм×1.27мм). Внутрисосудистой части дополнительно придавали изгиб. Поясок фиксируется в том же месте, что и у артериального катетера. В отличие от бедренного катетера на сосудистую часть венозного катетера натягивается силиконовая трубка ВТСИЛ-037, которая делается на 3-4 мм длиннее, чем сосудистая часть. Для этого отрезанный кусок силиконовой трубки погружают в эфир и через несколько секунд, не вытаскивая трубку из эфира, проталкивают туда сосудистый участок катетера. Внутрисосудистая часть венозных катетеров имеет такую длину и загиб для того, чтобы дотягиваться до правого предсердия. Силиконовая трубка, которая натягивалась сверху полиуретановой, значительно мягче её и предназначена для уменьшения травмирования эндотелия предсердия свободным концом катетера и, соответственно, на уменьшение обрастания и тромбообразования в этом месте.

### III.4 Хирургические манипуляции

Операции проводили в операционной комнате после предварительной кварцевания длительностью не менее часа с использованием хирургической платформы SurgiSuite Kent Scientific. Крысу наркотизировали препаратом золетил-100 внутривенно из расчёта 0.1 мл препарата на 100 г веса животного. После этого выбривали 3 участка: паховую область слева, шейную область между ключицей и нижней челюстью слева, а также холку. Крысам вживляли 3 сосудистых комбинированных полиуретановых катетера (Instechlabs, США): артериальный катетер вживляли в левую бедренную артерию, 2 венозных катетера с дополнительной удлиненной силиконовой оболочкой - BTSIL-037 для минимизации повреждения эндокарда) через левую яремную вену вводили в правое предсердие. Катетеризацию осуществляли стандартным способом. Во время операции производился постоянный подогрев тела животного. Катетеры подключали к трёхканальному устройству прямого хронического сосудистого доступа (УСД, VABR3B/22, Instechlabs, США – рис 3.5.2 В), которое имплантировали на холку в сформированный под кожей карман. Осуществляли постоперационную антисептическую обработку (стрептоцид, повидон-йод); в течение трёх (5 дней в случае гематурии) дней в период восстановления крысам вводили гентамицин (0.1 мл/100 г, в.б.). На холке под кожей при помощи изогнутого москита освобождался карман для имплантации устройства прямого сосудистого доступа (УСД) – VAB (vascular access button, Рис 3.5.2, В). К его штекерам подключались артериальный и венозные катетеры. После чего проверялась проходимость каналов, устройство заправлялось в карман и ушивалось. Остальные раны тоже ушивались крестным швом.

После операции в течение трёх дней крысам вводили гентамицин 0.1 мл на 100г веса. В случае гематурии гентамицин вводили до пяти дней. В эксперимент животное брали обычно на пятый-шестой день после операции.

### III.5 Экспериментальная установка

Мы использовали модифицированную экспериментальную установку, совместимую с имплантируемыми УСД. Используемые модификации облегчают рутинные манипуляции с животными и расширяют экспериментальные возможности, поэтому будут описаны подробно.

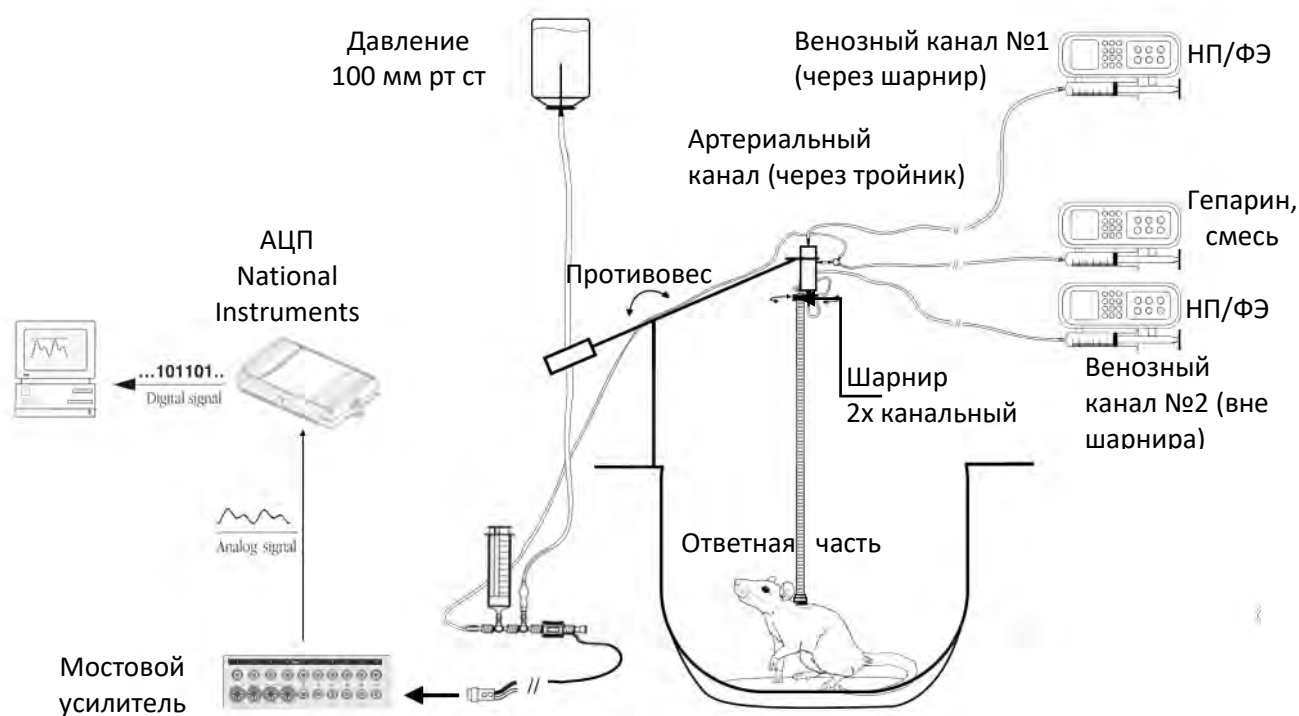


Рис 3.5.1 Схема экспериментальной установки

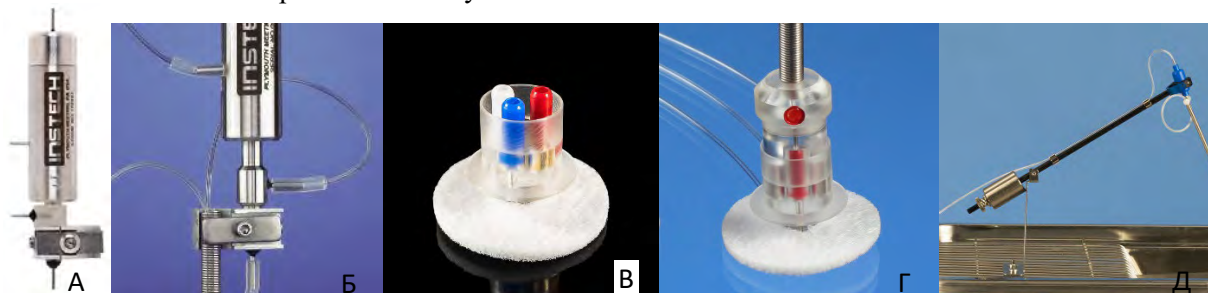


Рис 3.5.2 Элементы блока работы с бодрствующей крысой (Insteck) А. Шарнир (375/D/22), Б. Шарнир с переходом в ответную часть к УСД (375/D/22, VABR3T/25), В. УСД (VABR3B/22), Г. УСД с ответной частью к нему (VABR3B/22, VABR3T/25), Д. Противовес (CM375BS)

На рис. 3.3 представлена схема установки для регистрации гемодинамических показателей. В ней можно выделить три основных приборных блока: блок для работы с сигналом давления, блок для инфузии и блок для работы непосредственно с крысой. В наших экспериментах использовалась регистрация гемодинамических параметров для двух животных одновременно.

Блок для работы с сигналом давления состоит из 3х приборов: мостового усилителя, АЦП National Instruments и компьютера с ПО от National Instruments (драйверы, библиотека LabView RunTime Engine) и программы Data Acquisition, сделанной в среде LabView (разработчик – Лукошкова Е. В.).

Блок для инфузии состоит из шприцевых инфузионных помп для введения трёх растворов: нитропруссид натрия (НП), фенилэфрина (ФЭ) и смеси физраствора с гепарином (рис. Рис 3.5.2). Гепариновая смесь стандартная для всех – 10% раствор гепарина (5000 Ед). НП и ФЭ разводились в соответствии с весом крысы. На каждую крысу приходится 3 шприца. Для введений и в вены, и в артерии использовались стеклянные шприцы Hamilton 1002 TLL на 2.5 мл с байонетным затвором. НП и ФЭ вводились через внутривенные каналы, гепариновая смесь подавалась через тройник в артериальный канал с постоянной скоростью 1-1.5 мкл/мин для профилактики тромбообразования на катетере и сохранения качественного сигнала. Для введения растворов НП и ФЭ использовались помпы Harvard Apparatus Pump 11 Elite Infusion/Withdrawal, которые имеют опцию линейно менять скорость ввода. В растворы НП и ФЭ также добавлялся гепарин.

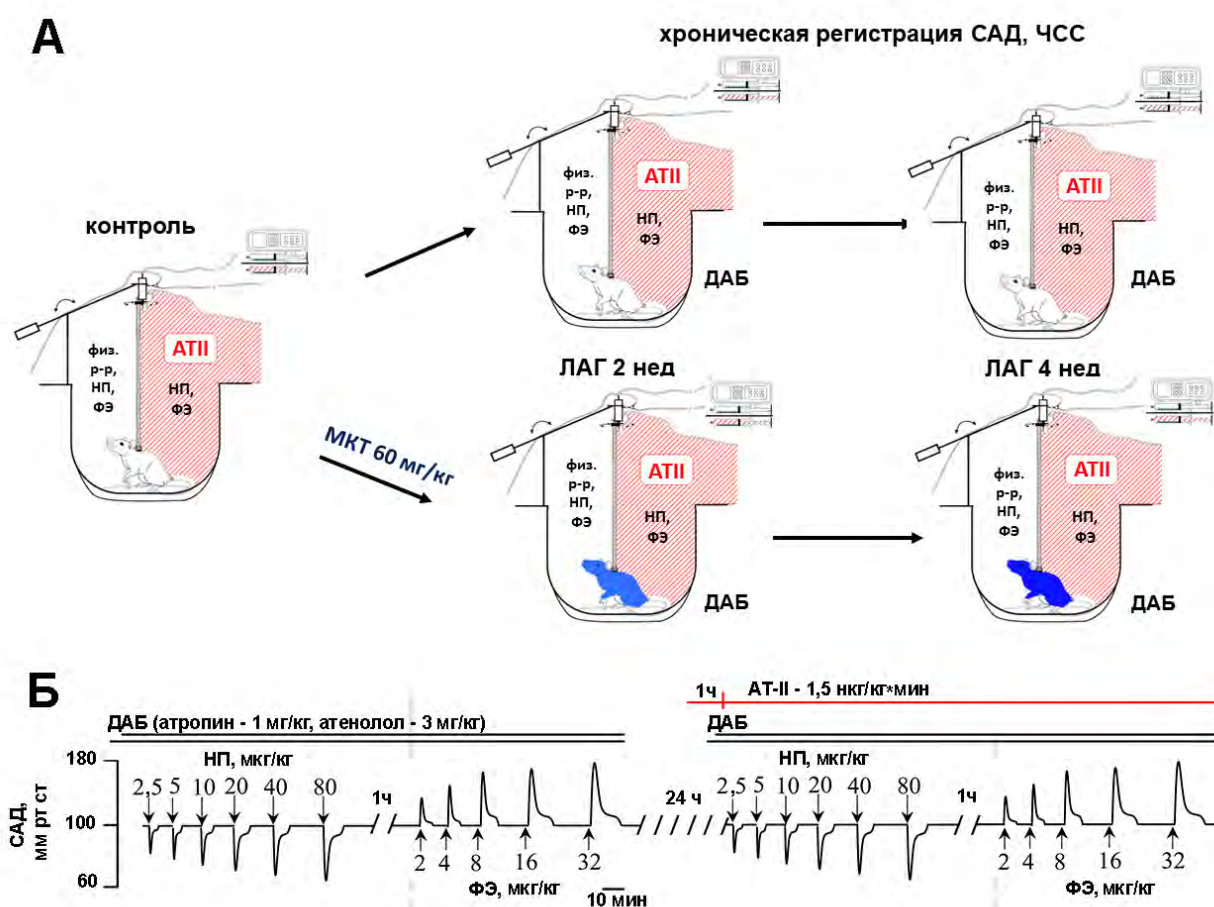
Блок для работы с крысой состоит контейнера, в который помещается крыса, приспособлений (Instechlabs, США) для подключения через УСД к её катетерам артериальной и венозных линий и датчика давления, соединённого через систему трёхходовых инфузионных переключателей с артериальной линией и калибровочным стандартом давления (рис 3.5.2), который представляет из себя банку со смесью физраствора и спирта, подвешенной на высоте 136 см и представляющей таким образом столб жидкости, создающий давление 100 мм рт. ст.

Артериальная линия, выполненная из полиэтиленовой трубки PE-50, соединялась с датчиком давления через шарнир (рис 3.5.2, 3.5.3 А, Б) и имела выход на тройник (рис 3.5.2), для постоянной промывки гепариновой смесью. Приспособления, с помощью которых сосудистые линии подключаются к катетерам, состоят их ответной части УСД (VABR3T/25, рис 3.5.3 Г), двухканального поворотного шарнира (375/D/22), тройника для артериальной линии (SCY22) и противовеса (CM375BS, рис 3.5.3 Д), который основанием закреплен над ёмкостью с крысой, а на своём свободном конце имеет посадочное место для шарнира (рис 3.5.3 Д). УСД с 3мя каналами (VABR3B/22, Instechlabs, США) тоже можно рассматривать, как элемент установки (рис. 3.5.3 В). Это имплантат, в котором 3 канала представлены железными штекерами, которые проходят через пластиковую основу. Каждый штекер снаружи впрессован в запирающий элемент своего цвета. Ответная часть (рис. 3.5.3 Г) состоит из пластикового основания с отверстиями, соответствующими запирающим элементам УСД. Фиксация УСД и ответной части к нему достигаются за счёт магнитной

защелки. Стальная пружина вокруг каналов ответной части защищает их от перекусывания крысой. Все описанные приспособления позволяют отключать животное от установки и подключать обратно одним движением. В подключенном состоянии противовес не даёт провисать ответной части, крыса её не видит и не обращает на неё внимания.

### III.6 Исследования сосудистого тонуса в экспериментах на бодрствующих животных *in vivo*

#### III.6.1 Протокол эксперимента по регистрации дозозависимых изменений сосудистого тонуса *in vivo* («доза-ответ»)



**Рис 3.6.1** Моделирование ЛАГ (А) и схема (Б) индукции вазомоторных ответов в сосудистом русле большого круга кровообращения. Синий цвет – формирующаяся ЛАГ (2 нед), фиолетовый цвет – сформированная ЛАГ (4 нед). Красная штриховка - инфузия ангиотензина II

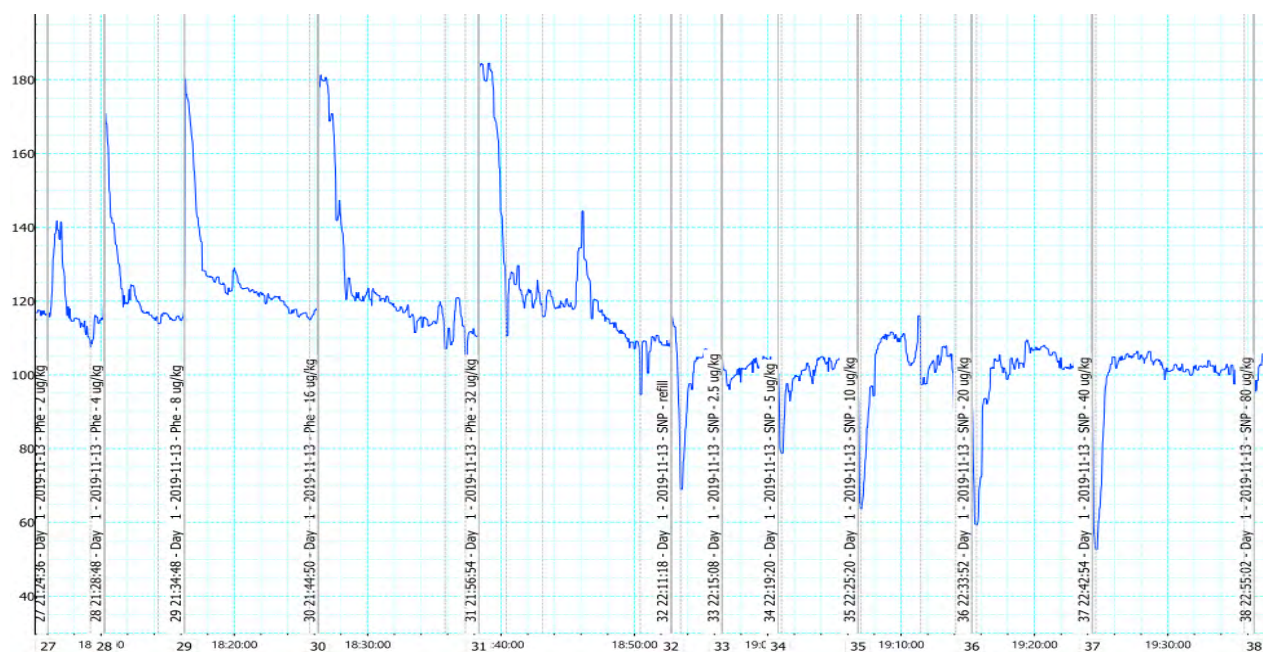
По окончании постоперационного периода восстановления, а также на 14-й и 28-й (рис. 3.6.1 А) день после инъекции МКТ после 30 мин периода адаптации и контрольной записи САД, животным вводили нитропруссид натрия (НП, Sigma Aldrich) в последовательно возрастающих дозах от 2,5 до 80 мкг/кг в объеме 0,3 мл за 3 мин с интервалами 10 или 20 мин (рис. 3.6.1 Б). Не менее чем через 1 ч после окончания введения

НП, стабилизации САД и промывки катетера осуществляли введение агониста  $\alpha 1$ -АР фенилэфрина (ФЭ, Sigma Aldrich) в последовательно возрастающих дозах от 2 до 32 мкг/кг в объеме 0,3 мл за 1 мин с интервалами 10-20 мин (рис. 3.6.1 Б). Инфузию ФЭ и НП осуществляли на фоне предварительно индуцированной двойной автономной блокады (ДАБ) атенололом (3 мг/кг, в-в) и атропином (1 мг/кг, в-в), осуществляемой для подавления барорецепторного изменения ЧСС в ответ на введение вазоактивных соединений.

В части экспериментов, на следующие сутки после введения НП и ФЭ повторяли эксперимент, но на фоне непрерывной инфузии ангиотензина II (1,5 нг/кг\*мин), которую начинали за 60 мин до введения первой дозы НП (рис 3.6.1 А, Б). Для параллельной инфузии АП II использовали второй внутривенный катетер.

### III.6.2 Предобработка результатов эксперимента по регистрации дозозависимых изменений сосудистого тонуса *in vivo* («доза-ответ»)

Для осуществления необходимых измерений записи экспериментов в двухсекундном усреднении открывались в программе LabChart 8.1.16 и обрабатывались с помощью модуля PeakAnalysis (на рис 3.6.2 типичный пример импортированной записи).

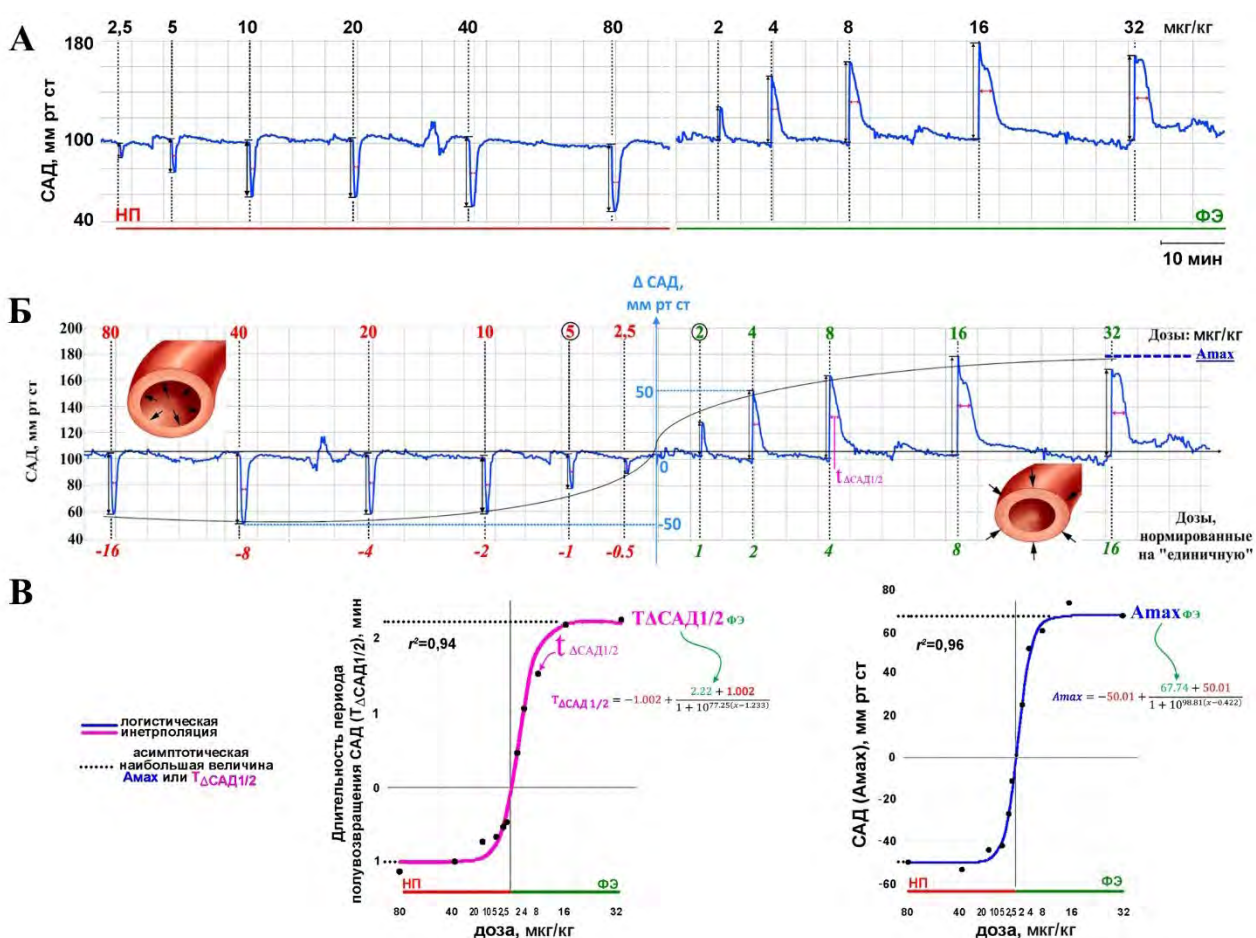


**Рис 3.6.2** Типичный эксперимент по определению сосудистого тонуса  
 Для очистки записей от шума использовался медианный фильтр. Для каждого быстрого изменения давления (пика) в ответ на фенилэфрин или нитропруссид натрия рассчитывались следующие показатели: амплитуда (Amax), длительность на уровне полуамплитуды ( $T_{\Delta САД 1/2}$ ). Эти 2 параметра можно измерить с походящей точностью и дать им физиологическую интерпретацию: амплитуда пика - это быстрая непосредственная реакция сосудистого русла на вещество (вазоконстриктор и вазодилататор), т.е. фактически

способность сосуда приобретать определённый тонус, ДП50 - это время полувозвращения сосудистого тонуса к норме, т.е. способность приобретённый тонус удерживать.

### III.6.3 Аппроксимация результатов эксперимента по регистрации дозозависимых изменений сосудистого тонуса *in vivo* («доза-ответ»)

Традиционно, моделирование дозозависимостей производится при помощи логистических уравнений. Как можно заметить из Рис 3. А, быстрые изменения САД в ответ на болюсные введения обоих вазоактивных агентов начиная с третьей-четвёртой дозы меняются слабо, поэтому было решено экспериментальные данные по двум противоположно действующим на САД веществам аппроксимировать одной логистической кривой (рис 3.6.3 Б).



**Рис 3.6.3** Методика определения  $A_{max}$  и  $T_{\Delta САД 1/2}$

Чтобы это сделать, мы считали, что нитропруссид – это «фенилэфрин наоборот» и брать для нитропруссид натрия оба измеряемых параметра –  $A_{max}$  и  $T_{\Delta САД 1/2}$  со знаком «-», так как нитропруссид оказывает на сосудистый тонус обратный эффект по сравнению с фенилэфрином. По оси X откладываются дозы и к ним применяли тот же подход, что и к экспериментально измеряемым параметрам, то есть дозы для нитропруссид натрия откладывали со знаком «-». Однако, как можно увидеть из Рис 3., дозе фенилэфрина 2 мкг/кг по амплитуде соответствует доза нитропруссид натрия 5 мкг/кг, а не 2.5 мкг/кг, поэтому введены

«относительные дозы» (рис 3.6.3 Б, нижние значения). Для значения для всех доз фенилэфрина были нормированы на значение его первой дозы – 2 мкг/кг, а значения всех доз нитропрусида натрия нормированы на значение его второй дозы – 5 мкг/кг (рис 3.6.3 Б, нижние значения). Тогда ось X будет состоять из следующего набора относительных доз: -16,-8,-4,-2,-1,-0.5,1,2,4,8,16 (рис 3.6.3 Б, нижние значения). Затем для каждого эксперимента строили индивидуальную логистическую кривую, используя индивидуальные значения амплитуд изменения САД или индивидуальные значения времени полувозвращения САД, определяемые при введении каждой дозы вазоактивного соединения (рис. 3.6.3 Б, В), методом аппроксимации [An и др., 2019; Ritz и др., 2015] с помощью четырехпараметрической логистической кривой вида:

$$y(x) = c + \frac{d-c}{1+10^{b(x-\bar{e})}}, \text{ где}$$

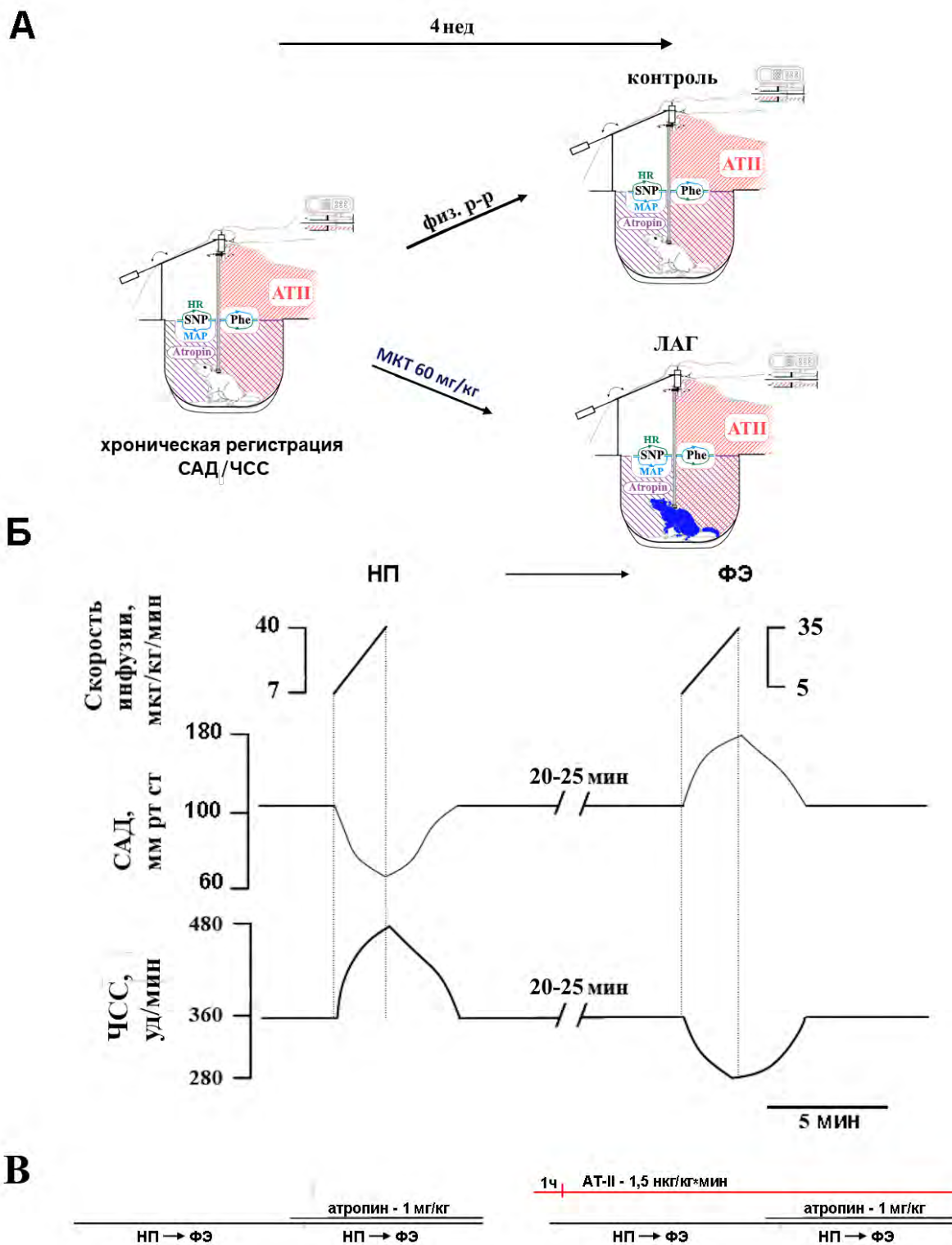
$\bar{e}$  – абсцисса точки перегиба кривой,  $b$  – коэффициент наклона,  $c$  – нижняя асимптота,  $d$  – верхняя асимптота, получали регрессионную кривую.

В качестве  $A_{max}$  или  $T_{\Delta САД 1/2}$  использовали асимптотические значения (равные коэффициенту  $d$ ) регрессионной кривой (рис. 3.6.3 В) для минимизации вариабельности межиндивидуальной широты диапазона реакций САД, а также вариабельности полумаксимальной эффективной концентрации вазоактивных соединений.

Вычисляли максимальную возможную величину (амплитуду,  $A_{max}$ ) изменения САД и наибольшую длительность периода полувозвращения САД ( $T_{\Delta САД 1/2}$ ) к исходному уровню у крыс в ответ на введение НП или ФЭ.

### III.7 Исследование барорефлекторной функции у бодрствующих животных in vivo

#### III.7.1 Протокол эксперимента по регистрации барорефлекторной реакции



**Рис 3.7.1 А.** Схема экспериментальных воздействий в группах при моделировании ЛАГ. Светло-синий – формирующаяся ЛАГ (2 нед), синий – сформированная ЛАГ (4 нед). Красная штриховка - инфузия ангиотензина II. Фиолетовая штриховка – инфузия атропина. МКТ –

монокроталин, **Б.** Схематическое представление вазомоторных ответов в сосудистом русле большого круга кровообращения при оценке барорецепторной реакции (БРР), **В.** Схема, демонстрирующая последовательность применения вазомоторных соединений при оценке БРР. САД – среднее артериальное давление, НП – нитропруссид натрия, ФЭ – фенилэфрин.

Инфузию вазоактивных соединений осуществляли через внутривенные катетеры, подключенные к УСД при помощи шприцевых программируемых инфузионных помп (Harvard Apparatus Pump 11 Elite Infusion/Withdrawal, США) со шприцами Hamilton 1002 TLL (2.5 мл, байонетный затвор), воспроизводя протокол повышения концентраций фенилэфрина (ФЭ) и нитропруссид натрия (НП) из [Head, McCarty, 1987] с изменениями, перечисленными ниже.

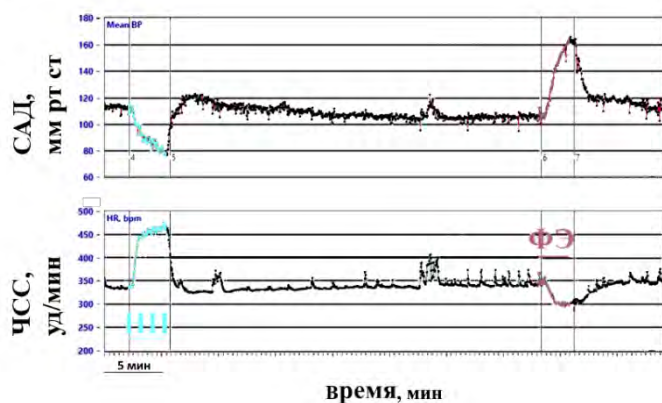
По окончании постоперационного периода восстановления, а также на 28-й (рис. 3.7.1 А) день после инъекции МКТ после 30 мин периода адаптации и контрольной записи САД/ЧСС, животным вводили р-р нитропруссид натрия (1 мкг/кг/мл, в ф. р-ре, Sigma Aldrich) с линейно нарастающей скоростью инфузии («рамповое» введение) от 7 до 40 мкг/кг/мин за 3.5 мин (суммарный объём – 82.25 мкл рис. 3.7.1 Б). Затем дожидались возвращения САД и ЧСС (20-25 мин) к контрольному уровню и осуществляли введение агониста  $\alpha$ 1-адренорецепторов ( $\alpha$ 1-АР) фенилэфрина (1 мкг/кг/мл в ф.р-ре, Sigma Aldrich) с линейно нарастающей скоростью инфузии от 5 до 35 мкг/кг/мин за то же время, что и НП (суммарный объём - 70 мкл, рис. 3.7.1 Б). Через час животным вводили р-р атропина (1 мг/кг, в/в, 0.3 мл) для блокады парасимпатической компоненты барорецепторного рефлекса. Инфузию ФЭ и НП осуществляли повторно, но на фоне атропина (рис. 3.7.1 В).

В части экспериментов, на следующие сутки повторяли эксперимент, но введение вазоактивных соединений и атропина осуществляли на фоне непрерывной инфузии ангиотензина II, который добавляли в промывочную смесь для артериального катетера (АТII, 1,5 нг/кг/мин, в/в 1% БСА в ф. р-ре, 2,5 % р-р гепарина 5000 Ед, суммарный объём ~400-500 мкл). Инфузию АТII начинали за 60 мин до введения НП (рис. 3.7.1 В). Для инфузии НП/ФЭ использовали два отдельных внутривенных катетера.

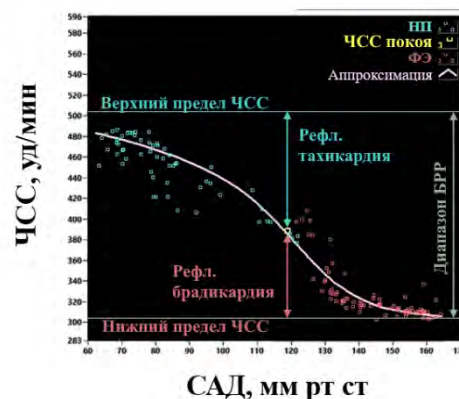
### **III.7.2 Предобработка показателей барорефлекторной реакции**

Для обработки показателей барорефлекса программно совмещались участки записи, на которых регистрируется САД и ЧСС во время реакции животного на введение нитропруссид натрия и фенилэфрина (рис. 3.7.2 А, Б). Это осуществляется в программе обработки данных Data Processing (автор – Лукошкова Е. В.)

А



Б



**Рис 3.7.2 А.** Репрезентативные записи, получаемые при последовательном анализе кардиоциклов и демонстрирующие синхронные отклонения САД и ЧСС при рамповом внутривенном введении животным нитропрусида (НП, голубой) или фенилэфрина (ФЭ, красный), **Б.** Репрезентативный пример кривой барорецепторной реакции (БРР), получаемой при логистической аппроксимации рефлекторного изменения ЧСС, вызванного введением нитропрусида и фенилэфрина. Показаны рассчитываемые характеристические параметры БРР. Горизонтальными линиями показаны наибольшее (сверху) и наименьшее (снизу) асимптотические значения, интерпретируемое как максимальное и минимальное значение ЧСС.

Помимо самих участков записей с изменениями параметров САД и ЧСС программа совмещает участки АД и ЧСС, предшествующие началу введения фармакологических агентов, поэтому перед каждым участком фармакологического изменения давления прописывается хотя бы минута фона. При совмещении всех четырёх необходимых элементов программа аппроксимирует их логистическим уравнением Хилла с четырьмя параметрами (4Р) 3.7.2 (Б) с помощью устойчивого алгоритма Левенберга-Маргката. Красным выделены точки, относящиеся к росту САД, обусловленного фенилэфрином, и фону перед этим, тогда как голубым обозначены точки, относящиеся к стадии падения САД, обусловленной нитропруссидом натрия. Программа позволяет выкинуть выбросы и сохраняет параметры, полученные в результате аппроксимации и отредактированные экспериментальные наблюдения без выбросов в текстовые файлы. Эти данные будут впоследствии использованы для построения статистической модели со смешанными эффектами.

### III.7.3 Аппроксимация барорефлекторной реакции логистической кривой

В ходе периода «рампового» введения НП или ФЭ вычисляли пары значений САД и ЧСС для каждого кардиоцикла (рис. 3.7.2 А). Последовательные пары значений САД и ЧСС использовали для построения регрессионной кривой барорецепторной реакции (кривой «САД-ЧСС», рис. 3.7.2 Б). Для получения регрессионной кривой использовали специализированное ПО («Data Processing», Лукошкова Е.В.) реализованное в среде LabView и основанное на ранее описанных численных методах аппроксимации [An и др., 2019; Ritz и

др., 2015] и алгоритмах Левенберга-Маргката. Четырехпараметрическая логистическая регрессионная кривая имеет уравнение вида:

$$y(x) = c + \frac{d-c}{1+\exp(b(x-\bar{e}))},$$

где  $\bar{e}$  – значение по оси абсцисс для точки перегиба кривой,  $b$  – коэффициент крутизны кривой,  $c$  – наименьшее асимптотическое значение, интерпретируемое как наименьшее достижимое (минимальное) значение ЧСС ( $ЧСС_{\min}$ ),  $d$  – наибольшее асимптотическое значение, интерпретируемое как наибольшее достижимое (максимальное) значение ЧСС ( $ЧСС_{\max}$ ), наблюдаемое при индукции барорецепторной реакции ФЭ и НП [Head, McCarty, 1987]. Асимптотические значения регрессионной кривой использовали для минимизации межиндивидуальной вариабельности широты диапазона отклонений САД и ЧСС при действии вазоактивных соединений.

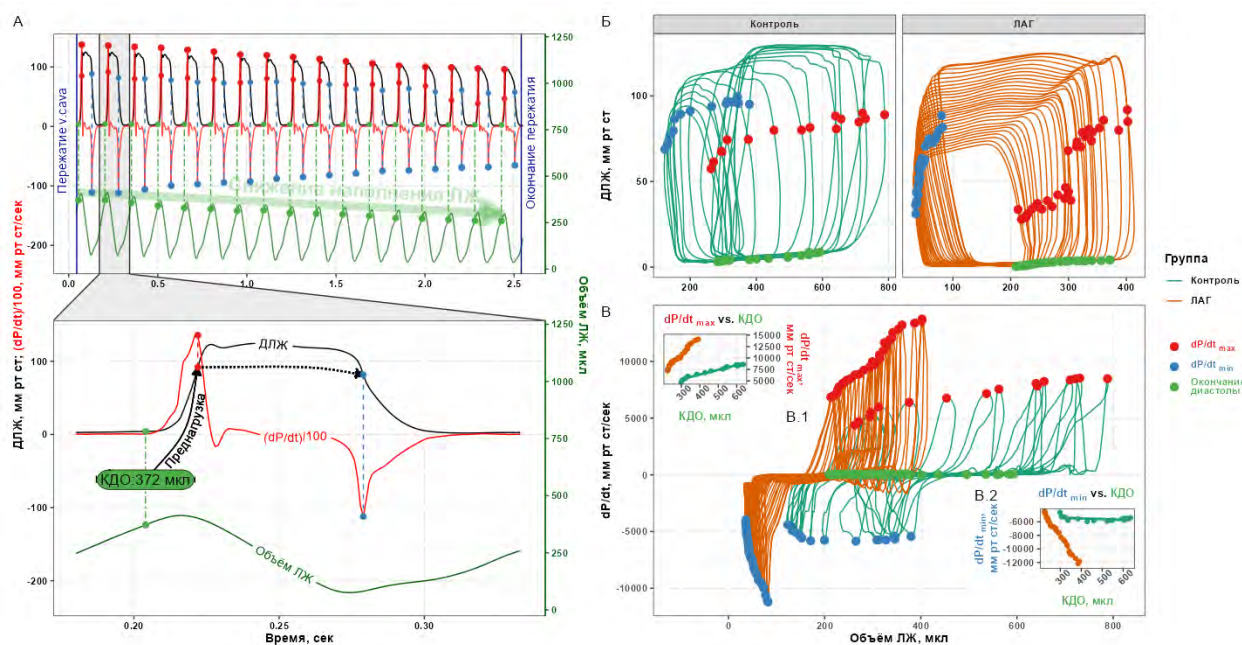
В качестве индекса чувствительности барорецепторной реакции (ИЧ<sub>БРР</sub>) использовали максимальное значение производной регрессионной кривой БРР. Используя регрессионную кривую также рассчитывали диапазон барорефлекторной реакции ( $A_{БРР}$ ) как разницу между  $ЧСС_{\max}$  и  $ЧСС_{\min}$ . Определяли ЧСС покоя как среднее значение ЧСС за 1 мин, наблюдаемое за 1 мин до введения вазоактивных соединений. Также рассчитывали величину рефлекторной тахикардии (ТК<sub>БРР</sub>) и брадикардии (БК<sub>БРР</sub>), как разность между  $ЧСС_{\max}$  или  $ЧСС_{\min}$  и ЧСС покоя. В тех случаях, когда в индивидуальных кривых БРР после аппроксимации параметры ( $ЧСС_{\min}$ ,  $\max$  и др.) принимали аномальные значения, использовали соответствующие значения параметров из нелинейной модели со смешанными эффектами, построенной по исходным данным для всех наблюдений.

### **III.8 Проведение экспериментов по сократимости ЛЖ**

Через 5 нед после введения МКТ (либо 0.3 мл физ. р-р контрольной группе) крыс с сформированной ЛАГ (либо контрольной группе), верифицированной на основе ультразвуковых признаков гипертрофии правого желудочка, брали в эксперимент [Абрамов и др., 2023; Spyropoulos и др., 2020; Zhu и др., 2019]. Перед экспериментом крыс наркотизировали (золетил-100, в.б., 0,1 мл/100 г). Для оценки индексов сократимости (ИС) через левую сонную артерию в полость левого желудочка вводили катетер (FTH-1912B-8018, ADInstruments, Австралия) для синхронной регистрации внутрижелудочкового давления (P), объема (V) и ЧСС; PV-катетер подключали к усилителю ADV500 (Transonic, Канада). С использованием ПО LabChart ADInstruments 8.1.2 (Австралия) строили кривые, отражающие изменение давления и объема в ЛЖ на протяжении сердечного цикла, а также фазовые

портреты для ЛЖ. На основании кривых рассчитывали конечно-систолическое давление (КСД), максимальную скорость его нарастания и спада ( $dP/dt_{max}$ ,  $dP/dt_{min}$ ), конечно-диастолический и конечно-систолический объемы (КДО, КСО), УО, фракцию выброса, ударную работу (площадь PV-петли) для ЛЖ, сердечный выброс (СВ) и артериальную упругость ( $AУ=КСД/КДО$ ).

Для оценки зависимости сократимости ЛЖ от его наполнения проводили окклюзионные тесты (ОТ) [Капелько и др., 2021; Лакомкин и др., 2022]. Окклюзионной лигатурой охватывали проксимальный постдиафрагмальный сегмент задней полой вены. При осуществлении ОТ снижение КДО к концу  $3\pm 0,5$  с (не более 15-20 кардиоциклов) периода окклюзии достигало  $50\pm 5\%$  (рис 3.10 А). В каждом эксперименте осуществляли до 6 ОТ с интервалами не менее 5 мин.



**Рис 3.8.1** Репрезентативный пример, демонстрирующий способ определения зависимости инотропии левого желудочка от конечно-диастолического объема с помощью окклюзионного теста, **А**. Участок синхронной записи давления (черная кривая) и объема (зеленая кривая) в левом желудочке в период от момента начала до момента окончания окклюзии (пережатия) задней полой вены (v. cava), сопровождаемый постепенным снижением конечно диастолического объема (КДО, зеленая стрелка, зеленые точки), уменьшением наибольшей скорости нарастания (красные точки) и спада (синие точки) давления в левом желудочке. Красная кривая – дифференцированная кривая давления ( $dP/dt$ ). Снизу (нижняя панель) показан второй кардиоцикл после начала периода окклюзии при большой развертке во времени. Зеленая вертикальная пунктирная линия и зеленые точки – момент окончания диастолы; красная вертикальная пунктирная линия – момент максимального нарастания давления ( $dP/dt_{max}$ ), синяя вертикальная пунктирная линия - момент максимальной скорости спада давления ( $dP/dt_{min}$ ); черная пунктирная стрелка -  $dP/dt_{max}$  не равняется  $dP/dt_{min}$ , но определяется величиной преднагрузки, **Б**. Репрезентативные фазовые портреты для левого желудочка в координатах «давление-объем», полученные у контрольного (слева, зеленый) животного и животного с ЛАГ (справа, оранжевый), **В**. То же, что на Б, но в координатах « $dP/dt$ -объем», **В.1**, **В.2** – репрезентативные линейные зависимости, построенные по точкам, соответствующим  $dP/dt_{max}$  (**В.1**) и  $dP/dt_{min}$  (**В.2**) отмеченным на фазовых портретах в Б и В для контрольных животных (зеленая кривая), и животных с ЛАГ (оранжевая кривая). ЛЖ – левый желудочек; ДЛЖ – давление в левом желудочке;  $dP/dt_{max}$ ,  $dP/dt_{min}$  - наибольшая скорость нарастания (max) и спада (min) давления в левом желудочке.

Окклюзионные тесты можно использовать, чтобы оценить влияние преднагрузки (КДО) на параметры сокращения ( $dP/dt_{max}$ ) и расслабления ( $dP/dt_{min}$ ) ЛЖ (рис 3.8.1 А, Б). Оба этих параметра практически линейно зависят от КДО (рис 3.8.1 В, В.1, В.2), поэтому для анализа данных окклюзионных тестов строили линейную модель со смешанными эффектами с помощью пакета lme4(v 1.1-34)[Bates и др., 2015], описывающую связь  $dP/dt_{max}$ ,  $dP/dt_{min}$  в ЛЖ с КДО.

### **III.9 Исследование изменений реакции гипоксической вазоконстрикции в хронических и острых экспериментах**

#### **III.9.1 Протокол экспериментов по определению реакции малого круга кровообращения на транзиторную гипоксию - ультразвук**

Интенсивность ГВР определяли перед инъекцией МКТ, а затем на вторую и четвертую недели после введения МКТ. ГВР оценивали в контрольных условиях, а также на фоне инфузии АТ-II в дозе 1.2 нг/кг/мин (Harvard Apparatus Pump 11 Elite). Интенсивность ГВР определяли по уменьшению конечно-диастолического объема (КДО), который определялся эхокардиографически (Vevo 1100 VisualSonic) с помощью линейного датчика MS250 с рабочей частотой 12 МГц при левостороннем парастернальном доступе к сердцу. Для оценки ГВР у наркотизированных (Золетил 100, 0,1 мл/100 г) животных, с предварительно установленным в хвостовую вену кубитальным катетером (22G) перед началом пробы определялся КДО при естественном дыхании, а затем в течение минуты животному, через ингаляционную маску, со скоростью 250-300 мл/мин подавали воздушную смесь с 10% содержанием O<sub>2</sub>. В начале и в конце периода подачи гипоксической смеси, а также через 1 мин после окончания транзиторной гипоксии определяли КДО. Аналогичную процедуру осуществлял фоне инфузии АТ-II через 10 мин. В расчёт брали усреднённое по нескольким кардиоциклам КДО для исходного этапа и этапа восстановления.

#### **III.9.2 Протокол экспериментов по определению реакции малого круга кровообращения на транзиторную гипоксию - катетер**

Животным со сформированной в течение 1.5-2 месяцев ЛАГ, индуцированной введением МКТ, проводили эхокардиографию описанным в главе III.1 способом. Затем животным с эхокардиографическими признаками ЛАГ и гипертрофии ПЖ вводили в хвостовую вену кубитальный катетер диаметром 22G и далее под наркозом (золетил – 0,1 мл/100г веса крысы), устанавливали в трахею трахеостомическую трубку и катетеризировали левый желудочек описанным в главе III.8 способом. Затем проводили поиск положения крысы, в котором положение PV-катетера максимально совпадало бы с длинной осью ЛЖ, а разница

между регистрируемыми катетером объёмами ЛЖ и референсными значениями из УЗИ-эксперимента не превышала бы 60-70 мкл. Убедившись в регистрации катетером близких к референсным значений объёмов ЛЖ, начинали эксперимент с газовыми пробами. Перед газовой пробой записывали 10-15 мин исходного состояния (steady state), после которого быстро подключали трахеостомическую трубку через тройник к баллону с гипоксической газовой смесью (10%O<sub>2</sub>), подающего её со скоростью 300-400 мл в мин. Газовая проба длилась ~3 мин, повторялась 3 раза с перерывами 8-12 мин, и прекращалась досрочно в случае слишком сильной реакции ГВР. После этого через кубитальный катетер в хвостовой вене начинали инфузировать с помощью Harvard Apparatus Pump 11 Elite АТII в дозировке 1.2-2 нг/кг/мин и, постепенно её увеличивая, проводили поиск дозы АТII, которая вызывала бы рост давления в ЛЖ. Как только соответствующая доза АТII была найдена, с ней записывался период стабильного состояния 10-15 мин, после которого на фоне инфузии найденной дозы АТII повторялись (3-6 раз) газовые пробы. Для одновременной регистрации объёма и давления ЛЖ использовали приборы, перечисленные в главе III.13. Из записей для дальнейшего анализа выбирались участки записи, содержащие газовую пробу целиком, а также 3 минуты до начала пробы и после её окончания. Параметры гемодинамики (объёмы ЛЖ, ЧСС и сердечный выброс) дискретизировали в этих участках с интервалом 250 мс. Затем эти участки агрегировали в общую для всех крыс таблицу, данные из которой аппроксимировались логистической (функция SSdIf из пакета nlrnaa[Oddi и др., 2019]) нелинейной моделью со смешанными эффектами для каждого параметра с помощью пакета nlme[Pinheiro, Bates, R Core Team, 2024], но с разбиением всех участков по моменту окончания гипоксической пробы на 2 отрезка – до и после окончания гипоксической пробы (для каждого отрезка строилась своя модель). Эти отрезки соответствуют гипоксической пробе и восстановлению параметров гемодинамики после гипоксической пробы. Для аппроксимации использовалась логистическая функция с альтернативной параметризацией:

$$y(x) = c + \frac{d-c}{1+\exp((x-\bar{e})/s)},$$

где  $s$  имеет интерпретацию на оси  $x$  (времени), представляя из себя время, за которое логистическая кривая проходит путь от 50% до 75% своего диапазона. Значения производной по времени для конечно-диастолического и систолического объёмов рассчитывали, используя аналитическую формулу для производной уравнения логистической кривой, доверительные интервалы для производных были построены с помощью дельта-метода (функция deltaMethod, пакет car[Fox, Weisberg, 2019]) на основании ранее построенных нелинейных моделей.

### III.10 Статистическое моделирование экспериментов на животных с построением моделей со смешанными эффектами, проверка статистических гипотез и визуализация результатов

Статистическую обработку полученных результатов проводили в среде R [R Core Team, 2020; RStudio Team, 2020]. Подготовка данных осуществлялась средствами пакетов обработки табличных данных семейства tidyverse [Wickham и др., 2019]. Наряду с параметрическими и непараметрическими вариантами дисперсионного анализа, мы активно использовали линейные и нелинейные модели со смешанными эффектами при необходимости ковариационного анализа.

В случаях, когда для обработки данных из экспериментов требовался ковариационный анализ, то есть при необходимости оценить характер связи между зависимой переменной-ответом ( $y$ ) и независимой непрерывной ковариатой ( $x$ ) для экспериментальных групп, либо же в ситуации, требующей более точного инструмента для работы с повторяющимися измерениями, строились статистические модели со смешанными эффектами, как оптимальное средство обработки экспериментов с повторяющимися измерениями [Zuur и др., 2009].

Для обработки экспериментов с задачей оценить углы наклона для линейных зависимостей для экспериментальных групп строились линейные модели со смешанными эффектами вида:

$$y_{ij} = \bar{\beta}_i + b_j + \epsilon_{ij};$$

$$b_i \sim \mathcal{N}(0, \sigma_b^2);$$

$$\epsilon_i \sim \mathcal{N}(0, \sigma^2);$$

средствами пакета *lme4* [Bates и др., 2015, с. 4]. В случае присутствия нелинейной логистической зависимости в экспериментах строились нелинейные модели со смешанными эффектами вида, где  $f(\phi_{ij}, v_{ij})$  – это нелинейная функция,  $\beta$  – фиксированные эффекты, для

$$y_{ij} = f(\phi_{ij}, v_{ij}) + \epsilon_i,$$

$$\phi_{ij} = A_{ij}\beta + B_{ij}b_i$$

$$b_i \sim \mathcal{N}(0, \sigma_b^2);$$

$$\epsilon_i \sim \mathcal{N}(0, \sigma^2);$$

которых рассчитываются среднее значение и дисперсия, а  $b_i$  – это случайные эффекты со средним значением 0, учитывающие индивидуальную вариабельность [Pinheiro, Bates,

2009]. Нелинейные модели строились с применением средств библиотеки *nlme* [Pinheiro, Bates, R Core Team, 2024].

Для тестирования статистических гипотез использовался пакет *emmeans* [Lenth, 2024]. Поправки на множественное тестирование проводились средствами пакета *emmeans* и *multcomp* [Bretz, Hothorn, Westfall, 2016].

В хроническом эксперименте по определению сосудистого тонуса *in vivo* статистически значимые различия между группами выявляли с помощью теста Фридмана для связанных выборок, либо теста Краскелла-Уоллеса для несвязанных (оба теста - непараметрическая альтернатива однофакторной ANOVA) с последующим применением апостериорных тестов (Вилкоксона для связанных выборок, Манна-Уитни для несвязанных выборок) для множественных сравнений в группах с повторными или независимыми, а также внесением поправки Холма. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ . Статистические тесты проводились с помощью пакета *rstatix* [Kassambara, 2020]. Данные представляли как медиана  $\pm$  абсолютное отклонение медианы за исключением репрезентативных записей. Визуализация данных выполнена средствами пакетов *ggplot2* [Wickham, 2016], *ggthemes* [Tiedemann, 2020] и *patchwork* [Pedersen, 2024a].

Аналогичный подход с использованием непараметрического теста Фридмана применялся для обработки данных хронического эксперимента по определению изменения интенсивности ГВР с развитием ЛАГ с применением апостериорных тестов Дурбина-Коновера и внесением поправки на множественное тестирование по Холму средствами пакета *ggstatsplot* [Patil, 2021]. Различия считались значимыми при  $p < 0,05$ . Данные представлены, как медиана  $\pm$  абсолютное отклонение медианы.

В экспериментах с определением сократимости и расслабимости ЛЖ при ЛАГ для расчёта медианных значений, Q1, Q3 внутрижелудочкового давления, объема на протяжении кардиоцикла использовали метод квантильной регрессии (пакет *quantreg* v 5.97 [Handbook of Quantile Regression, 2017]). Для оценки различий в расчётных показателях (индексе сократимости - ИС, сердечном выбросе - СВ и артериальной упругости) использовали непараметрический тест Манна-Уитни (пакеты *ggstatsplot* v 0.12.2 [Patil, 2021], *rstatix* v 0.7.2 [Kassambara, 2020], *ggpubr* v 0.6.0 [Kassambara, 2025]). Для анализа данных окклюзионных тестов строили линейную модель со смешанными эффектами с помощью пакета *lme4* (v 1.1-34) [Bates и др., 2015], описывающую связь  $dP/dt_{\max}$ ,  $dP/dt_{\min}$  в ЛЖ с КДО. Тестирование статистической гипотезы о равенстве угловых коэффициентов зависимостей « $dP/dt$ -КДО» между группами на полученной модели проводили с помощью t-теста (пакет *emmeans* v 1.10.0), степени свободы для которого были рассчитаны с аппроксимацией Кенварда-Роджера (пакет *pbrktest* v 0.5.2 [Halekoh, Højsgaard, 2014]). Различия считали

значимыми при  $p < 0.05$ . Полученные на модели значения приведены, как  $\text{ср.} \pm \text{ст.ош.}$ ; [доверительный интервал]. Графические построения выполняли средствами пакетов `marginalEffects` (v 0.18.0) [Arel-Bundock, Greifer, Heiss, 2024], `ggdist` (v 3.3.1) [Kay, 2024], `distributional` (v 0.3.2) [O'Hara-Wild и др., 2024], `ggplot2` (v 3.5.0) [Wickham, 2016], `ggghalves` (v 0.1.4) [Tiedemann, 2020], `geomtextpath` (v 0.1.1) [Cameron, Brand, 2022], `ggtext` (v 0.1.2), `patchwork` (v 1.2.0) [Pedersen, 2024a].

В хронических экспериментах с исследованием барорецепторной функции *in vivo* использовались как линейные, так и нелинейные модели со смешанными эффектами. Построение нелинейной модели логистических кривых со смешанными эффектами [Pinheiro, Bates, 2009] производили средствами пакета `nlme` [Pinheiro, Bates, R Core Team, 2024] с использованием уравнения убывающей логистической функции `SSd1f` из пакета `nlraa` [Miguez, Archontoulis, Dokoohaki, 2018] в 3 этапа: предварительная аппроксимация отдельных кривых (функции `nlsLMlist`, пакет `nlraa`), построение на их основе усредненной кривой (функция `nlme`); построение смешанной модели, включающей в себя кривые для каждой группы, с использованием параметров усредненной кривой [Oddi и др., 2019].

Для статистического анализа характеристических показателей БРР из результатов аппроксимации индивидуальных барорефлекторных кривых программой Е. В. Лукошковой «Data Processing» строили линейные модели со смешанными эффектами с помощью пакета `lme4` [Bates и др., 2015], что позволяло оценивать значимость различий в связанных и несвязанных группах. Проверка статистических гипотез для коэффициентов модели выполнялась с применением тестов Вальда и t-тестов, степени свободы для которых рассчитывались по методу Саттеруайта, средствами пакета `emmeans` [Lenth, 2024]. Различия между группами принимали значимыми при  $p < 0,05$ . Для ИЧБРР проверка статистических гипотез и расчёт доверительных интервалов производили на логарифмически трансформированных данных (на рисунках для ИЧБРР доверительные интервалы показаны без обратной трансформации). Для расчёта стандартных ошибок и доверительных интервалов в линейных моделях использовался пакет `clubSandwich` [Pustejovsky, 2024] с поправкой для малых выборок «CR1» [Pustejovsky, Tipton, 2018]. Поправку на множественные сравнения производили по методу Холма средствами пакета `multcomp` [Bretz, Hothorn, Westfall, 2016].

Данные представлены как  $\text{ср.} \pm \text{ст.ош. ср.}$  [нпДИ; впДИ], где нпДИ и впДИ – нижний и верхний пределы доверительного интервала. Для графического представления результатов анализа использовали пакеты `ggplot2` [Wickham, 2016], `ggghalves` [Tiedemann, 2020], `ggdist` [Kay, 2024] и `patchwork` [Pedersen, 2024a] среды R.

Для анализа связи ГВР с параметрами гемодинамики ЛЖ у крыс с ЛАГ с помощью PV-катетера строились нелинейные модели со смешанными эффектами тем же способом, который применялся для построения аналогичных моделей в экспериментах по исследованию барорефлекторной функции. Статистические гипотезы для параметров моделей тестировались с помощью пакета emmeans[Lenth, 2024].

Данные представлены как  $\text{ср.} \pm \text{ст.ош. ср. [нпДИ; впДИ]}$ , где нпДИ и впДИ – нижний и верхний пределы доверительного интервала. Для графического представления результатов анализа использовали пакеты ggplot2[Wickham, 2016], ggside[Landis, 2025], see[Lüdecke и др., 2021], geomtextpath[Cameron, Brand, 2022].

### **III.11 Анализ данных секвенирования транскриптома образцов выносящего тракта правого желудочка и устья легочного ствола**

Для транскриптомного анализа отбирали и пулировали фрагменты ткани лёгочного ствола (до артериальных клапанов) и обеих лёгочных артерий через 2,5 месяца после индукции ЛАГ (n=2), либо введения физ р-ра (n=2).

#### **III.11.1 Выделение РНК**

Тотальную РНК выделяли из ткани с использованием TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, США) и набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя. На первом этапе ткань гомогенизировали в TRIzol с применением шариков для гомогенизации. К полученной РНК добавляли 2 мкл RiboLock (Thermo Fisher Scientific, США). Качество тотальной РНК оценивали методом капиллярного электрофореза на системе Qsep400 (Bioptic, Тайвань) с использованием набора RNA Cartridge Kit R1-O-4CH (Bioptic, Тайвань). Количество РНК определяли с помощью набора Qubit RNA Broad Range (Thermo Fisher Scientific, США). Оценка целостности РНК проводилась по показателю RIN (RNA Integrity Number [Schroeder и др., 2006], который для всех образцов составлял не менее 7,0 (среднее значение  $8,5 \pm 1,0$ , n=4). Концентрация РНК во всех образцах была не ниже 4,6 нг/мкл (в среднем  $32,3 \pm 23,8$  нг/мкл, n=4). Результаты анализа целостности РНК представлены в табл. 1

#### **III.11.2 Подготовка РНК-библиотек и секвенирование**

Приготовление библиотек выполняли с использованием набора RNA seq Library Prep Kit for Illumina (Vazyme, Китай) в соответствии с протоколом производителя. Из 1 мкг тотальной РНК проводили выделение поли(А)-РНК с помощью магнитных гранул, конъюгированных с олиго(dT)-праймерами. Затем РНК фрагментировали и использовали для синтеза двухцепочечной кДНК. Синтез первой цепи кДНК осуществляли с использованием обратной транскриптазы SuperScript® II (Thermo Fisher Scientific, США). Контроль качества библиотек проводили методом капиллярного электрофореза на системе Qsep400 (Bioptic, Тайвань) с набором High Sensitivity Cartridge Kit (Bioptic, Тайвань). Концентрацию библиотек определяли с помощью набора SpectraQ HS (Raissol, Россия). Полученные библиотеки объединяли в эквимольных соотношениях. Секвенирование выполняли на платформе SURFSeq 5000 (GeneMind, Китай) с использованием набора SURFSeq 5000 Sequencing Kit V1.0 FCH 300 cycles (GeneMind, Китай). Результаты оценки качества транскриптомных библиотек представлены в табл. 2.

Таблица 3.11.1 Контроль качества выделенной РНК по данным капиллярного электрофореза.

Номер образца	Концентрация, нг/мкл	RIN (RQN)	Профиль Qsep400
4 (контроль)	405	7,58	

## **III.12 Анализ данных секвенирования**

### **III.12.1 Анализ данных секвенирования. Анализ дифференциальной экспрессии**

Прочтения, полученные в ходе РНК-секвенирования загружали на публичный сервер Galaxy[Boekel и др., 2015; Galaxy Community, 2024] и квантифицировали с помощью Salmon (1.10.1)[Patro и др., 2017]. Для квантификации использовался референсный набор последовательностей транскриптов из последней сборки генома крысы GRCr8[Jong de и др., 2024] и аннотации в формате NCBI Refseq[Goldfarb и др., 2025] к нему GCF\_036323735.1-RS\_2024\_02. В дальнейший анализ отфильтровывали гены с экспрессией, превышающей 1 rpkm (read per kilobase per million – 1 прочтение на 1000 пар оснований гена на миллион прочтений). Так как стандартный пайплайн для определения дифференциальной экспрессии генов был неприменим, рассчитывали статистики для коллекций генов и их ассоциаций. Для функциональной аннотации использовали коллекции Gene Ontology[Ashburner и др., 2000; Gene Ontology Consortium и др., 2023] (релиз 2024-09-08) – Biological Process (BP), Cellular Components (CC) и Molecular Functions (MF), а также коллекции Kegg Pathways [Kanehisa и др., 2023; Kanehisa, Goto, 2000](релиз 113.0, 2025-01-01), доступ к которым производился средствами пакетов семейства AnnotationDbi (1.68.0)[Pagès и др., 2024] – GO.db[Carlson, 2024a] и Org.Rn.en.db[Carlson, 2024b]. Визуализацию путей Kegg производили с помощью пакета pathview (1.46.0) [Luo, Brouwer, 2013]. Обогащение коллекций производили по идентификаторам NCBI Refseq с помощью пакета fgsea (1.32.4)[Korotkevich и др., 2021]. Профили обогащения коллекций, а также сводные представления наиболее обогащенных коллекций строили с помощью пакета plotthis[Wang, 2025](0.6.1). Для выявления генов, ассоциированных с наибольшим числом коллекций, все значимо обогащенные пути объединялись в один общий пул с поддержкой полнотекстовых описаний коллекций средствами пакета GSEABase[Morgan, Falcon, Gentleman, 2024], внутри которого средствами пакета Visse[Bhuva, 2024] проводили кластеризацию коллекций с выявлением для каждого кластера максимально аннотированных генов с наибольшей дифференциальной экспрессией и построением «облака слов» из полнотекстовых описаний коллекций. Кластеризация путей с приведением максимально аннотированных генов для кластера – единственный этап в работе, для которого мы отбирали коллекции без поправки p-value, чтобы повысить чувствительность процедуры.

### **III.12.2 Анализ данных секвенирования. Анализ переключения изоформ**

При анализе переключения изоформ, для каждого гена рассчитывался индекс структурных изменений изоформенного состава, представляющий из себя сумму взятых по модулю относительных изменений для всех генных изоформ, поделенную на 2 (индекс Лузмора-Хэнби). В дальнейший анализ переключения изоформ отбирались гены, отвечающие

преимущественным изменением изоформного состава – то есть такие гены, у которых индекс Лузмора-Хэнби превышал 0,5 при одновременном уровне изменения их экспрессии не более, чем в 2 раза. Обогащение коллекций GO и Kegg для этих генов производилось с помощью сервиса ShinyGO(0.84)[Ge, Jung, Yao, 2020]. Визуализация результатов производилась с помощью пакетов интерактивного редактирования данных DataCleanR(1.0.5)[Hurley, 2025] и небольших графов SNAhelper(1.4.2)[Schoch, 2025], а также с помощью пакетов построения и представления графов – tidygraph(1.3.1)[Pedersen, 2025], ggraph (2.2.1)[Pedersen, 2024b] и ggforce (0.4.2)[Pedersen, 2024c]. Анализ изоформных переключений включал в себя также анализ сплайсинговых событий и анализ последствий изоформных переключений применительно к последовательностям транскриптов генов, которые выполнялись с помощью пакетов IzoformSwitchAnalyser и SpliceR [Vitting-Seerup и др., 2014; Vitting-Seerup, Sandelin, 2017; Vitting-Seerup, Sandelin, 2019]. Анализ сплайсинговых событий также повторялся для всех генов, прошедших фильтр по уровню экспрессии, без выделения субпопуляции с активным изоформным переключением, с использованием подхода, описанного для пакета. Анализ изоформных переключений включал в себя также анализ белковых последовательностей, в ходе которого выполнялся поиск функциональных доменов в последовательностях с помощью pfam\_scan.pl(1.6) из базы Pfam (Pfam37.2)[Mistry и др., 2021], определение внутренне-неупорядоченных регионов белков (ВНР) с помощью сервиса IUPred2A[Mészáros, Erdos, Dosztányi, 2018], топологический анализ последовательности (сервис DeepTMHMM[Hallgren и др., 2022]) с определением мембранных, цитоплазматических и экстраклеточных участков изоформы, предсказание локализации изоформы (сервис DeepLoc2[Thumulari и др., 2022]), определение присутствия сигнального пептида в изоформе (сервис SignalP 6.0[Teufel и др., 2022]), а также определение кодирующего потенциала изоформы с помощью сервиса CPC2[Kang и др., 2017]. Агрегация данных экспрессии и анализа последовательностей выполнялась пакетом IzoformSwitchAnalyser как в виде графической репрезентации для отдельных генов, так и в виде описания изменений молекулярного фенотипа их групп.

### **III.12.3 Анализ данных секвенирования. Поиск химерных транскриптов**

Поиск химерных транскриптов между парами генов производился с помощью STAR-Fusion (1.14.0) в соответствии с инструкцией разработчика[Naas и др., 2017].

### III.13 Реактивы и расходные материалы

Список реактивов, использованных в ходе выполнения работы приведен в табл. 3.13.1

Название	Фармакологическая активность	Производитель	Растворитель	Рабочая концентрация
Фенилэфрин (ФЭ)	Агонист $\alpha_1$ -адренорецепторов	Sigma-Aldrich	H <sub>2</sub> O	0.4 мг/мл
Нитропруссид натрия (НП)	Прямой донатор NO	Sigma-Aldrich	H <sub>2</sub> O	1 мг/мл
Атропин	Блокатор М-холинорецепторов	Sigma-Aldrich	H <sub>2</sub> O	10 мг/мл
Атенолол	Блокатор $\beta$ -адренорецепторов	Sigma-Aldrich	H <sub>2</sub> O	30 мг/мл
Ангиотензин-II (АТ-II)	Агонист АТ-рецепторов	Sigma-Aldrich	H <sub>2</sub> O+BSA (10%)	1.2 мг/мл
BSA	стабилизатор АТ-II	Sigma-Aldrich	H <sub>2</sub> O	10 мг/мл
Монокроталин	индуктор ЛАГ	Sigma-Aldrich	H <sub>2</sub> O+HCl	5 мг/мл

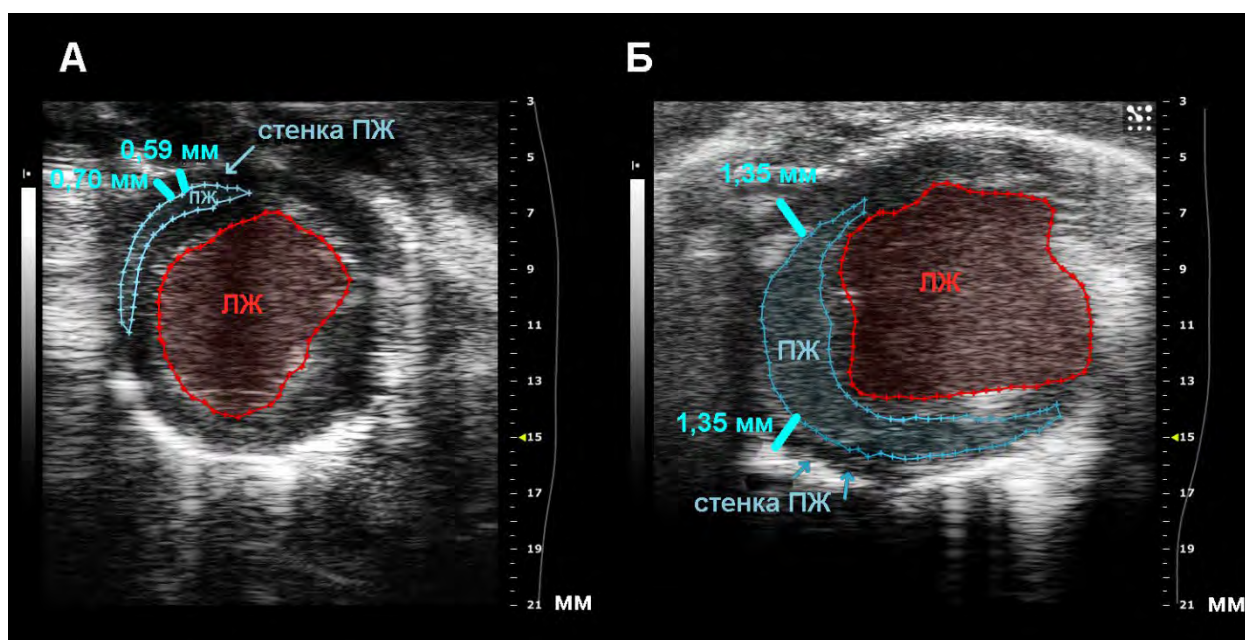
Таблица 3.13.1 Фармакологические агенты, используемые в работе

## IV. Результаты

### IV.1 Тонус сосудов при индукции вазомоторных ответов в сосудистом русле большого круга кровообращения крыс с ЛАГ

#### IV.1.1 Морфологические и функциональные признаки ЛАГ у крыс после введения МКТ

Однократная инъекция МКТ приводит к возникновению морфологических и функциональных признаков формирования ЛАГ у крыс. Толщина стенки правого желудочка (ТсПЖ) увеличивается от  $0,651 \pm 0,076$  мм до  $0,9 \pm 0,148$  мм и  $0,9 \pm 0,267$  мм через 2 и 4 нед после введения МКТ ( $n=7$   $p < 0,01$ ), соответственно (рис. 4.1.1). Синхронно с изменениями ТсПЖ, увеличивается диаметр легочной артерии: от  $2,46 \pm 0,133$  мм до  $2,8 \pm 0,193$  мм через 2 нед и до  $3,4 \pm 0,371$  мм ( $n=7$ .  $p < 0,01$ ) через 2 и 4 нед после введения МКТ, соответственно.



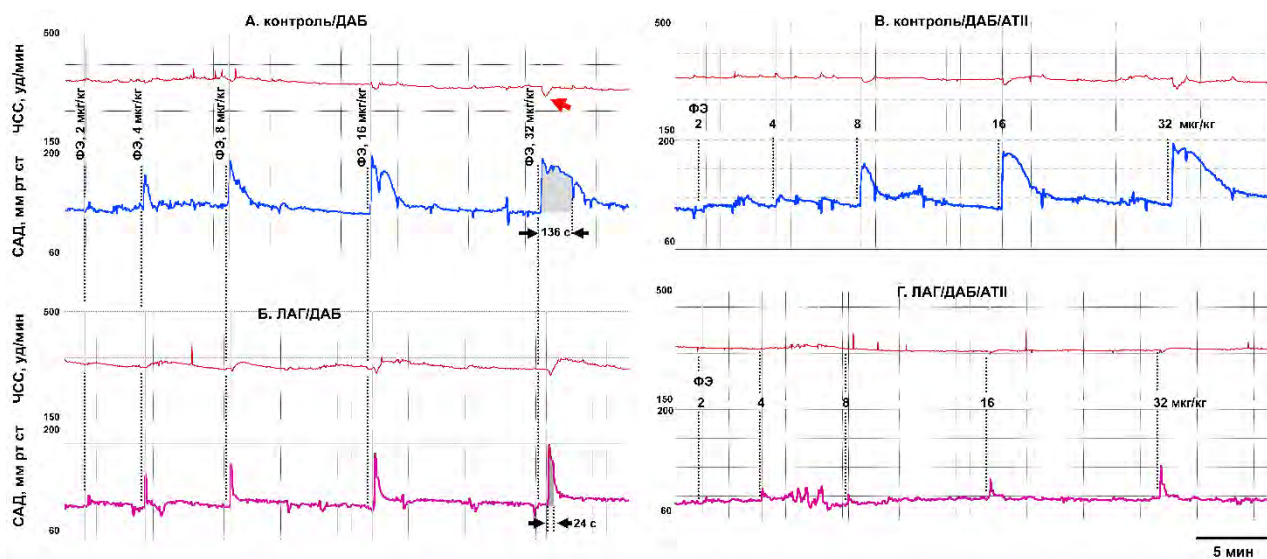
**Рис. 4.1.1.** Оценка толщины стенки правого желудочка (ПЖ) при УЗИ сердца, **А.** Репрезентативный пример УЗИ-изображения стенки ПЖ крысы исходно, **Б.** То же, что и на **А**, у для крысы 4 нед после инъекции монокроталина и индукции ЛАГ. ПЖ; голубой линией показана толщина стенки ПЖ, определяемая по короткой оси ЛЖ на уровне средних сегментов ЛЖ в момент окончания диастолы.

Индекс сократимости ПЖ снижается до  $1 \pm 0,133$  мм и  $1,1 \pm 0,148$  мм от  $1,3 \pm 0,148$  мм ( $n=7$ ,  $p < 0,01$ ), соответственно, к 2 и 4 нед после инъекции МКТ. Отношение АТ/ЕТ у крыс через 2 и 4 нед после введения МКТ снижается от  $0,3 \pm 0,049$  до  $0,23 \pm 0,068$  и  $0,206 \pm 0,038$  ( $n=7$ ,  $p < 0,01$ ), через 2 и 4 нед после введения МКТ, что указывает на прогрессирующий рост сосудистого сопротивления в малом круге кровообращения.

При формировании ЛАГ у крыс не происходит значимого изменения ударного объема и фракции выброса левого желудочка: УО до введения МКТ и через 4 нед после его инъекции составляет  $280 \pm 35$  и  $310 \pm 38$  мкл ( $n=7$ ,  $p > 0,1$ ); ФВ до введения МКТ –  $67 \pm 9\%$ ; через 4 нед –  $72 \pm 8\%$  ( $n=7$ ,  $p > 0,1$ ).

#### IV.1.2 Максимальная величина изменения САД при действии фенилэфрина у крыс ЛАГ

В контрольной группе животных через 4 нед после начала эксперимента САД в условиях покоя составляло  $105 \pm 11$  мм рт ст ( $n=6$ ). У крыс с ЛАГ через 4 нед после введения МКТ ( $n=8$ ) САД мало отличалась от такового у контрольных животных ( $109 \pm 14$  мм рт ст,  $p>0,1$ ). В контрольных условиях введение ФЭ на фоне ДАБ приводит быстрому дозозависимому, но транзиторному увеличению САД. Болюсное введение ФЭ в дозах 2-32 мг/кг вызывает рост САД, пиковое значение которого (от  $100 \pm 11$  до  $180 \pm 12$  мм рт ст при действии 32 мг/кг ФЭ) достигается за 3-5 с и сопровождается возвратом артериального давления к исходному уровню за 25-280 с ( $n=6$ , рис 4.1.2 А). Максимальная возможная величина изменения САД ( $A_{\max}$ ) у контрольных животных значимо не меняется в течение 4 нед и составляет  $61 \pm 13$  (исходно),  $75 \pm 13,6$  мм рт ст (4 нед,  $n=6$ ,  $p>0,05$ ). Такой же тип реакции в ответ на болюсное введение ФЭ наблюдается у животных с ЛАГ. После введения МКТ (4 нед)  $A_{\max}$  не меняется: исходно этот параметр в данной группе животных составляет  $67,74 \pm 1,32$ , а через 4 нед  $71,17 \pm 12,84$  мм рт ст ( $p>0,05$ ). Максимальная возможная величина изменения САД у крыс с ЛАГ и контрольных животных статистически значимо не различается ( $p>0,05$ ).



**Рис. 1.1.2.** Репрезентативные примеры вазоконстрикторных ответов, возникающих в русле большого круга кровообращения после активации  $\alpha_1$ -адренорецепторов фенилэфрином у контрольных крыс и крыс с ЛАГ.

**А.** Среднее артериальное давление (САД, в каждой панели *снизу*) и ЧСС (в каждой панели *сверху*) у контрольных крыс с двойной автономной блокадой (ДАБ) через 4 недели после начала эксперимента («контроль/ДАБ») при болюсном последовательном введении возрастающих доз фенилэфрина (ФЭ, 2-32 мг/кг).

**Б.** САД и ЧСС у крыс с ЛАГ (4 нед) на фоне ДАБ («ЛАГ/ДАБ») при болюсном последовательном введении возрастающих доз фенилэфрина (4 нед после введения МКТ, ФЭ, 2-32 мг/кг).

**В.** САД и ЧСС у контрольных крыс (4 нед) на фоне ДАБ («контроль/ДАБ/АТII») при болюсном последовательном введении возрастающих доз фенилэфрина (ФЭ, 2-32 мг/кг) при непрерывной внутриартериальной инфузии ангиотензина II (АТII, 1,5 нг/кг\*мин).

**Г.** САД и ЧСС у крыс с ЛАГ (4 нед) на фоне ДАБ («ЛАГ/ДАБ/АТII») при болюсном последовательном введении возрастающих доз фенилэфрина (ФЭ, 2-32 мг/кг) при непрерывной внутриартериальной инфузии ангиотензина II (АТII, 1,5 нг/кг\*мин).

#### **IV.1.3 Длительность периода полувозвращения САД к исходному уровню при действии фенилэфрина у крыс с ЛАГ**

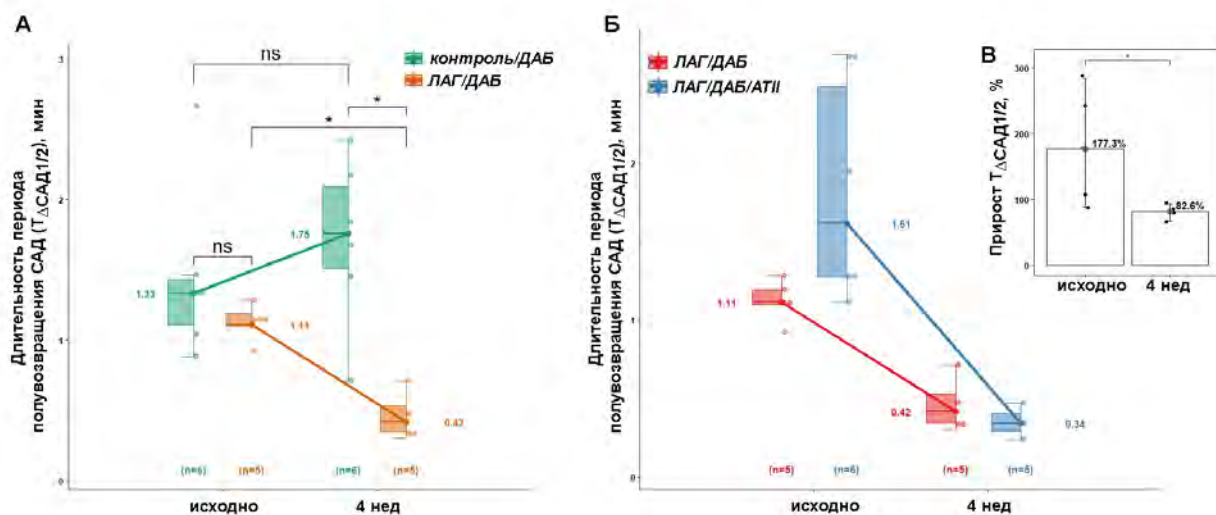
У контрольных животных максимальная длительность периода полувозвращения САД к исходному уровню ( $T_{\Delta САД1/2}$ ) после его транзиторного роста, вызванного ФЭ на фоне ДАБ составляет  $1,33 \pm 0,11$  мин в первый день (исходно) или  $1,75 \pm 0,21$  мин ( $n=6$ ) через 4 нед после начала эксперимента (рис 4.1.2 Б, рис 4.1.3 А). У крыс с ЛАГ через 4 нед ( $n=5$ ) после введения МКТ  $T_{\Delta САД1/2}$  оказывается в три раза меньше ( $0,42 \pm 0,12$  мин,  $n=5$ ,  $p=0,019$ ), чем у контрольных крыс. Уменьшение  $T_{\Delta САД1/2}$  у крыс с ЛАГ, по сравнению с контрольными животными наблюдается для всего диапазона протестированных доз ФЭ (2-32 мкг/кг, рис. 4.1.2 Б).

#### **IV.1.4 Влияние ангиотензина-II на время полувозвращения и максимальную величину изменения САД, вызванного фенилэфрином**

Ангиотензин незначительно усиливает рост САД, вызванный ФЭ у контрольных животных: Амах на фоне АТII составляет  $80,5 \pm 11,3$  мм рт ст (4 нед,  $n=6$ ,  $p>0,1$ ). У крыс с ЛАГ АТII вызывает противоположный эффект – ослабление прессорного ответа, вызванного ФЭ: Амах составляет  $31,85 \pm 6,53$  мм рт ст, (4 нед после введения МКТ,  $n=5$ ,  $p=0,01$ ).

У контрольных животных АТII вызывает увеличение длительности периода полувозвращения САД к исходному уровню после введения 2-32 мкг/кг ФЭ (рис 4.1.2 В); на фоне АТII  $T_{\Delta САД1/2}$  возрастает до  $1,75 \pm 0,53$  мин (4 нед после начала эксперимента,  $n=6$ ,  $p=0,02$ ).

У животных группы «ЛАГ/ДАБ» до введения МКТ ангиотензин вызывает увеличение  $T_{\Delta САД1/2}$  на  $77,3 \pm 6,5\%$  ( $n=6$ ,  $p=0,009$ ) по сравнению с таковым, наблюдаемым без АТII. Однако, через 4 нед после введения МКТ у животных данной группы сформировавшей ЛАГ ангиотензин II не оказывает усиливающего действия на прессорные эффекты ФЭ. Более того, величина  $T_{\Delta САД1/2}$  наблюдаемая на фоне инфузии ангиотензина II у крыс с ЛАГ составляет всего  $0,34 \pm 0,05$  мин ( $n=5$ ) или только 82% от таковой, регистрируемой без АТII (рис 4.1.2 Г, рис 4.1.3 В).



**Рис. 4.1.3 А.** Наибольшая длительность периода полувозвращения САД ( $T_{\Delta SAD_{1/2}}$ ) к исходному уровню после вазоконстрикторной реакции, вызванной введением фенилэфрина (ФЭ) у контрольных крыс («контроль/ДАБ») и крыс с ЛАГ («ЛАГ/ДАБ», до введения и через 4 нед после введения МКТ). **Б.** То же, что на «А», но у крыс с ЛАГ до («ЛАГ/ДАБ») и после инфузии ангиотензина II (АТII, «ЛАГ/ДАБ/АТII»). **В.** Прирост  $T_{\Delta SAD_{1/2}}$ , вызываемый АТII в контроле и при ЛАГ. ns – не значимо; \* -  $p < 0,05$  (тест Фридмана (двухфакторная ANOVA) с апостериорными сравнениями).

#### IV.1.5 Длительность периода полувозвращения и максимальная величина изменения САД, вызванного нитропруссидом натрия у крыс с ЛАГ

В контрольных условиях введение нитропруссида натрия (НП 2,5-80 мкг/кг) на фоне ДАБ приводит быстрому, транзиторному, дозозависимому снижению САД. Максимальная возможная величина снижения САД у контрольных животных не меняется в течение 4 нед и составляет  $51 \pm 7$  мм рт ст ( $n=6$ ). Такое же снижение САД наблюдается у крыс через 4 нед после введения МКТ:  $A_{max}$  составляет -  $53 \pm 8$  мм рт ст ( $n=5$ ,  $p > 0,1$ ). Кроме того, ЛАГ не влияет на длительность периода восстановления исходного уровня САД после его снижения, вызванного НП:  $T_{\Delta SAD_{1/2}}$  у контрольных крыс и крыс через 4 нед после введения МКТ оказывается практически одинаковым –  $1,1 \pm 0,08$  ( $n=6$ ) и  $1,05 \pm 0,08$  ( $n=5$ ), соответственно. Ангиотензин II не вызывал заметного изменения реакции САД ( $A_{max}$  и  $T_{\Delta SAD_{1/2}}$ ), вызванной введением НП как у контрольных животных, так и у крыс с ЛАГ.

#### IV.2 Чувствительность барорецепторной реакции при ЛАГ

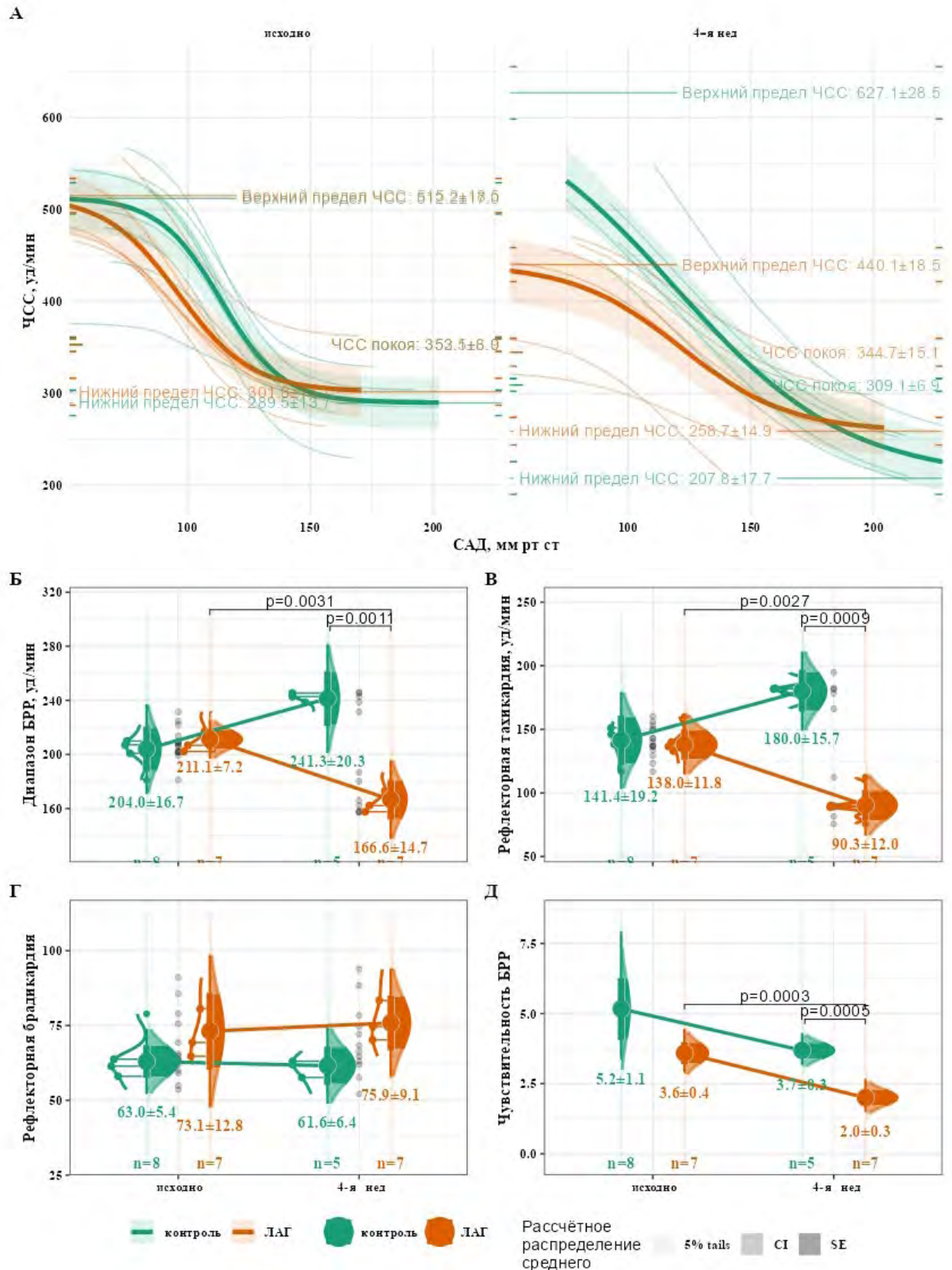
##### IV.2.1 Влияние ЛАГ на рефлекторную тахикардию, брадикардию, диапазон и чувствительность барорецепторного рефлекса

В наших экспериментах, введение вазоконстриктора (ФЭ) с постепенно нарастающей скоростью приводило к немедленному, градуальному повышению САД, а также снижению ЧСС за счет индукции барорецепторного рефлекса. В свою очередь, рамповое введение вазодилатора (НП) приводило к немедленному снижению САД и росту ЧСС.

Дозозависимое рефлекторное изменение ЧСС, вызванное введением вазоактивных соединений, имело типичный, сигмоидальный характер (рис. 4.2.1 А). Наибольшая достижимая ЧСС у крыс контрольной группы в начале эксперимента составляла  $512.17 \pm 16.7 [478.9; 545.5]$ , а наименьшая -  $289.5 \pm 13.7 [262.6; 316.4]$  уд/мин (рис. 4.2.1 А, панель «исходно»). Диапазон барорефлекторной реакции у крыс контрольной группы составлял  $204.0 \pm 16.7 [170.9; 237.1]$  уд/мин (рис. 4.2.1 Б, Табл.1).

У крыс с ЛАГ (4 нед после введения МКТ) наибольшая достижимая ЧСС значительно меньше ( $p=0.001$ ) по сравнению с исходным уровнем и составляет  $440.1 \pm 18.49 [403.9; 476.3]$  уд/мин; наименьшая достижимая ЧСС значительно не меняется и составляет  $258.7 \pm 14.9 [229.4; 288.0]$  уд/мин (рис. 4.2.1 А, панель «4-я нед»). Т.о. ЛАГ приводит к значимому уменьшению рефлекторной тахикардии (от  $138.0 \pm 11.9 [114.5; 161.5]$  до  $90.3 \pm 12.0 [66.4; 114.2]$  уд/мин,  $p=0.0029$ , рис. 4.2.1 В), а также диапазона барорефлекторной реакции (от  $211.1 \pm 7.4 [196.9; 225.4]$  до  $166.6 \pm 14.6 [137.4; 195.8]$ ,  $p=0.0031$ , рис. 4.2.1 Б), но не влияет на рефлекторную брадикардию (рис. 4.2.1 Г). Также, у крыс с ЛАГ значимо ( $p=0.0005$ ) уменьшается индекс чувствительности барорецепторной реакции (рис. 4.2.1 Г), ( $3.58 \pm 0.38 [2.89; 4.43]$  и  $2.02 \pm 0.29 [1.52; 2.68]$ , Табл.1).

У контрольных крыс к 4 нед после начала эксперимента, в противоположность животным с ЛАГ, наблюдается значимое увеличение ЧСС<sub>max</sub> ( $p < 0.001$ ), большее, чем у животных с ЛАГ, изменение ЧСС<sub>min</sub> ( $p=0.0052$ , рис. 4.2.1 А), что приводит к увеличению  $A_{БРР}$  и  $ТК_{БРР}$ ; у контрольных животных  $ИЧ_{БРР}$  падает незначительно. Величины ЧСС<sub>max</sub>, ЧСС<sub>min</sub>,  $A_{БРР}$ ,  $ТК_{БРР}$ ,  $ИЧ_{БРР}$  значимо превышают таковые, наблюдаемые у крыс с ЛАГ (Рис. 4.2.1 Б, В, Д,  $p \leq 0.0011$ , Табл.1).



**Рис 4.2.1** Влияние ЛАГ на барорефлекторное изменение ЧСС и характеристики барорецепторной реакции **А**. Кривые барорецепторной реакции (БРР), полученные с использованием нелинейной модели со смешанными эффектами. Зелёным цветом обозначены кривые для контрольной («контроль») группы животных (для момента начала – «исходно», через 4 нед после начала эксперимента – «4-я нед»), а оранжевым - для группы «ЛАГ», т.е. животных до введения и

через 4 нед после введения МКТ. Тонкими линиями показаны аппроксимированные кривые для отдельных экспериментов (животных); полупрозрачными лентами обозначены доверительные интервалы. На графиках указаны аппроксимированные значения ЧСС покоя и максимально достижимые пределы ЧСС. ЧСС покоя, пределы ЧСС, а также ст.ош.ср. для этих величин отмечены цветными горизонтальными отрезками на оси ординат. Панели представлены в одинаковом масштабе по обеим осям, **Б.** Диапазон барорецепторной реакции, **В.** Рефлекторная тахикардия, **Г.** Рефлекторная брадикардия. **Д** Индекс чувствительности БРР. На панелях Б-Д приведены точные значения  $p$  ( $t$ -тест); доверительный интервал (CI) и ст.ош.ср. (SE) показаны интенсивностью цвета. Кумулятивные плотности распределения для групп показаны слева в виде оранжевых (ЛАГ) и зеленых (контроль) огибающих контуров. Описательные характеристики выборок (верхний и нижний квартиль, медиана) показаны горизонтальными линиями на контуре. Индивидуальные значения показаны серыми точками. На панелях приведены средние значения  $\pm$  ст.ош.ср для каждой группы.

период экспер-та	исходно		4-я неделя	
	контроль (перед введением ф.р-ра)	ЛАГ (перед введением МКТ)	контроль (4 нед после введения ф.р-ра)	ЛАГ (4 нед после введения МКТ)
ЧСС <sub>max</sub>	512.2±17.0[478.9;545.5]	515.2±18.5[478.9;551.6]	627.1±28.5[571.2;682.9]	440.1±18.5[403.9;476.3]
ЧСС <sub>max</sub> : АТИ	512.0±16.3[480.1;544.0]	525.1±18.7[488.5;561.7]	491.0±22.7[446.5;535.5]	403.9±21.1[362.5;445.3]
ЧСС покоя	353.1±8.0[337.2;369.0]	352.5±6.9[338.8;366.2]	309.1±6.9[295.3;322.9]	344.7±15.1[314.6;374.8]
ЧСС покоя: АТИ	355.5±11.1[333.4;377.7]	357.5±10.7[336.1;378.8]	334.3±10.8[312.8;355.9]	343.0±15.0[313.2;372.8]
ЧСС <sub>min</sub>	289.5±13.7[262.6;316.4]	301.8±14.7[273.0;330.7]	207.8±17.7[173.1;242.5]	258.7±14.9[229.4;288.0]
ЧСС <sub>min</sub> : АТИ	277.8±13.1[252.2;303.4]	262.7±15.0[233.3;292.0]	162.9±20.7[122.3;203.4]	292.4±17.3[258.5;326.3]
А <sub>БРР</sub>	204.0±16.7[170.9;237.1]	211.1±7.2[196.9;225.4]	241.3±20.3[201.0;281.7]	166.6±14.7[137.4;195.8]
А <sub>БРР</sub> : АТИ	198.2±21.2[156.1;240.3]	209.6±18.5[172.9;246.4]	166.7±13.1[140.8;192.7]	117.8±16.3[85.3;150.3]
ТК <sub>БРР</sub>	141.4±19.2[103.1;179.6]	138.0±11.8[114.5;161.5]	180.0±15.7[148.7;211.3]	90.3±12.0[66.4;114.2]
ТК <sub>БРР</sub> : АТИ	131.5±17.1[97.4;165.6]	151.2±21.5[108.3;194.1]	106.9±8.9[89.2;124.7]	62.2±9.2[44.0;80.4]
БК <sub>БРР</sub>	62.5±5.2[52.0;72.9]	73.1±12.9[47.4;98.8]	61.5±6.4[48.7;74.2]	76.2±9.3[57.8;94.7]
БК <sub>БРР</sub> : АТИ	66.8±10.5[45.9;87.7]	58.4±7.4[43.7;73.1]	59.9±7.5[45.0;74.9]	55.9±14.1[27.7;84.0]
ИЧ <sub>БРР</sub>	5.2±1.1[3.4;7.9]	3.6±0.4[2.9;4.4]	3.5±0.3[3.0;4.2]	2.0±0.3[1.5;2.7]
ИЧ <sub>БРР</sub> : АТИ	4.0±0.8[2.8;5.9]	5.3±1.1[3.5;8.0]	2.4±0.3[1.9;2.9]	2.7±0.6[1.8;4.2]
n/n <sub>АТИ</sub>	8/9	7/7	5/5	7/5

**Табл 4.2.1.** Характеристические значения ЧСС и параметров барорецепторной реакции в группе контрольных животных (контроль), получавших в начале эксперимента физ. р-р., а также в группе

животных, получавших в начале эксперимента р-р. МКТ (ЛАГ), и сформировавших к 4-й неделе признаки ЛАГ (правая колонка). Значения параметров приведены на момент начала эксперимента («исходно», левые колонки) и к моменту окончания 4-й недели эксперимента («4-я неделя», правые колонки). В нижней части каждой графы для каждой группы приведены значения ЧСС и параметры барорецепторной реакции, получаемые на фоне инфузии ангиотензина II (АТII).  $N_{\text{АТII}}$  – количество животных, получавших АТII.

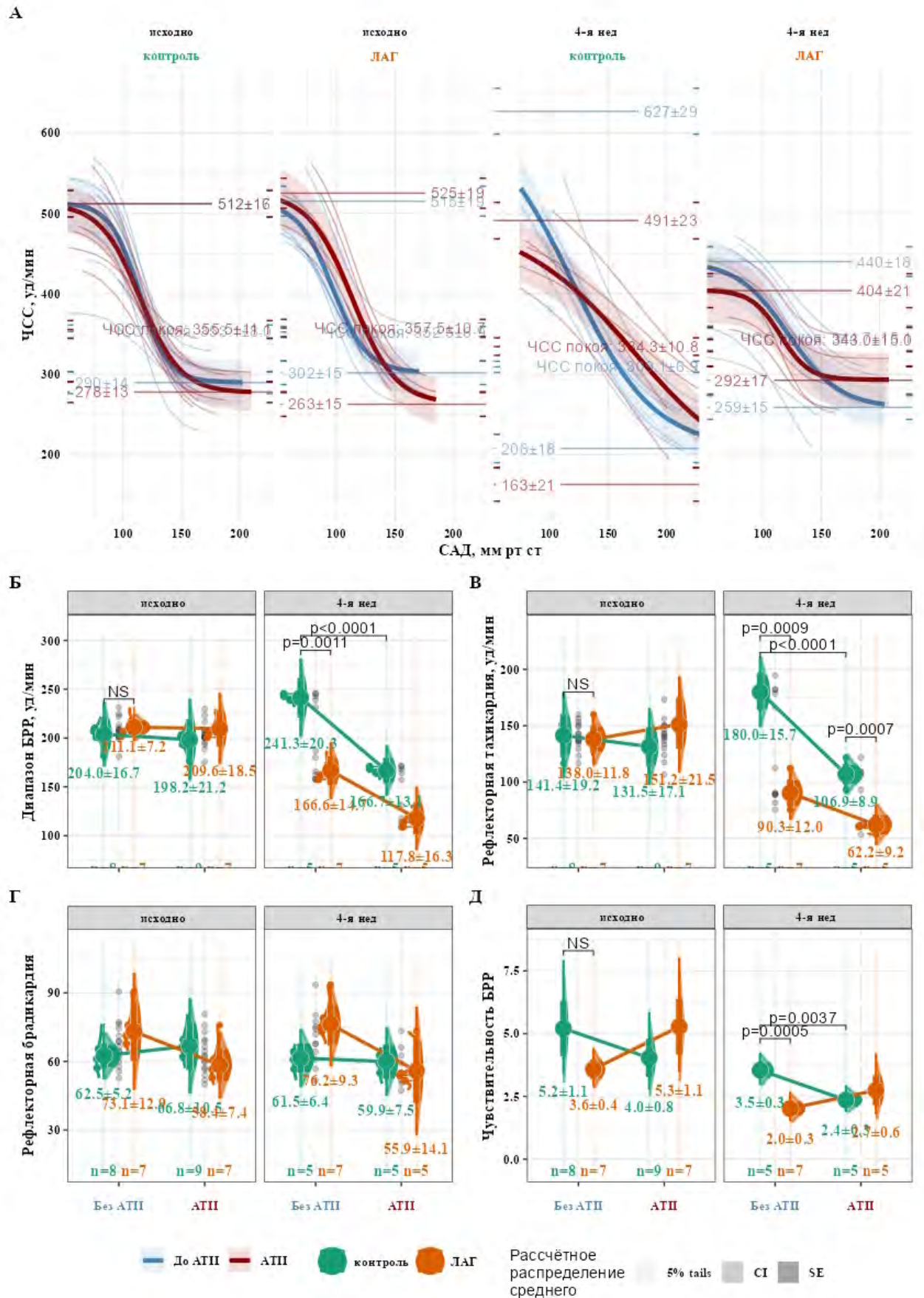
МКТ – монокроталин;  $\text{ЧСС}_{\text{max}}$  - наибольшее асимптотическое (максимальное достижимое) значение ЧСС; ЧСС покоя – значение ЧСС, наблюдаемое до введения вазоактивных соединений;  $\text{ЧСС}_{\text{min}}$  - наименьшее асимптотическое (минимальное достижимое) значение ЧСС;  $A_{\text{БРР}}$  - диапазон (амплитуда) барорецепторной реакции;  $\text{ТК}_{\text{БРР}}$  - величина рефлекторной тахикардии;  $\text{БК}_{\text{БРР}}$  - величина рефлекторной брадикардии;  $\text{ИЧ}_{\text{БРР}}$  - индекс чувствительности барорецепторной реакции.

#### **IV.2.2 Влияние ангиотензина II на диапазон и чувствительность барорецепторного рефлекса при ЛАГ**

Ангиотензин II не вызывает немедленного значимого изменения ЧСС покоя, а также не меняет наибольшую и наименьшую достижимую ЧСС (рис. 4.2.2 А, панели «исходно»). Т.о. в наших экспериментах при действии АТII не наблюдается изменения  $A_{\text{БРР}}$ ,  $\text{БК}_{\text{БРР}}$ ,  $\text{ТК}_{\text{БРР}}$ , а также  $\text{ИЧ}_{\text{БРР}}$  (рис. 4.2.2 Б-Д, панель «Исходно») у животных в начале эксперимента.

Тем не менее, при повторном введении через 4 нед после начала эксперимента инфузия АТII приводит к заметным изменениям барорецепторной реакции. Эффекты, индуцируемые АТII, различаются у крыс с ЛАГ (4 нед после введения МКТ) и животных контрольной группы. В обеих группах при действии АТII наблюдается снижение максимальной ЧСС и уменьшение рефлекторной тахикардии. Однако, у крыс с ЛАГ в результате действия АТII максимальная ЧСС и  $\text{ТК}_{\text{БРР}}$  изменяются менее значимо, чем у животных контрольной группы (рис. 4.2.2 В, панель «4-я нед»). Также,  $\text{ЧСС}_{\text{min}}$  у крыс с ЛАГ на фоне АТII значимо отличается от этого параметра у контрольных животных ( $p < 0.001$ , рис 4.2.2 А, панель «4-я нед/ЛАГ»). Крысы с ЛАГ при действии АТII демонстрируют тенденцию к уменьшению  $\text{БК}_{\text{БРР}}$  (рис. 4.2.2 Г, «4-я нед»), однако, различия между группами оказываются незначимыми, поскольку у контрольных животных АТII на 4-й нед эксперимента вызывал значительное повышение ЧСС покоя (Табл. 4.2.1).

И в контрольной группе животных (на 4-ю нед) и у животных с ЛАГ введение АТII приводит к значимому снижению  $A_{\text{БРР}}$  (рис. 4.2.2 Б, панель «4-я нед»). Однако, у контрольных животных этот эффект АТII преимущественно реализуется за счет снижения наибольшей достижимой ЧСС (при повышенной ЧСС покоя) и ослабления рефлекторной тахикардии, а у животных с ЛАГ как за счет снижения рефлекторной тахикардии, так и брадикардии (рис. 4.2.2 Б-Д).



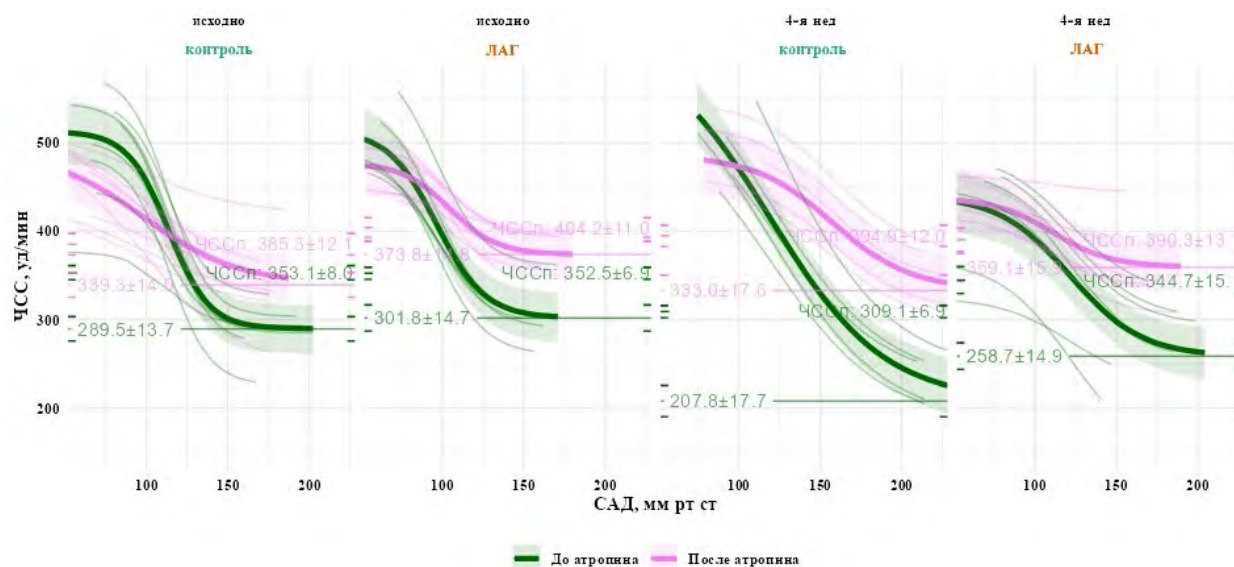
**Рис. 4.2.2.** Влияние ангиотензина II (АПІ) на характеристики барорецепторной реакции при ЛАГ. А Кривые барорецепторной реакции (БРР), полученные с использованием нелинейной модели со смешанными эффектами. Кривые БРР показаны для контрольной группы крыс («контроль») на

момент начала и через 4 нед после начала экспериментов; для группы животных до введения («исходно/ЛАГ») и через 4 нед после введения МКТ («4-я нед/ЛАГ»). Голубым цветом обозначены кривые БРР до введения, а красным - кривые, полученные на фоне инфузии АТП. Обозначения дов. интервалов, аппроксимированных кривых для отдельных экспериментов, отметки на оси ординат и масштаб осей, а также приведенные на панелях аппроксимированные значения такие же как на рис. 4.2.1 А. На панелях Б-Д представлены отдельные характеристики БРР у контрольных животных (зелёный) и животных с ЛАГ (оранжевый), определяемые до и в ходе инфузии АТП. Характеристики БРР приведены для начала («исходно») и через 4 нед («4-я нед») после начала эксперимента. Панели «Исходно» и «4-ая неделя» даны в одинаковом масштабе по оси ординат, Б. Диапазон БРР, В. Рефлекторная тахикардия, Г. Рефлекторная брадикардия, Д. Индекс чувствительности БРР. Обозначения р значений, дов. интервалов, ошибок среднего, плотностей распределения и описательных статистик такие же, как на рис.4.2.1. На панелях приведены средние значения  $\pm$  ст.ош.ср для каждой группы.

### IV.2.3 Изменение парасимпатического компонента барорецепторного рефлекса при ЛАГ

Во всех экспериментальных группах атропин вызывает увеличение ЧСС покоя, уменьшение рефлекторной брадикардии; также, наименьшая достижимая ЧСС на фоне атропина во всех группах выше, чем в контрольных условиях. Атропин не вызывает значимого изменения наибольшей достижимой ЧСС как в контрольной группе, так и у животных с ЛАГ (рис.4.2.3). Атропин уменьшает  $A_{БРР}$  в контрольной группе животных и у животных с ЛАГ, за счет изменения  $ЧСС_{min}$  и  $БК_{БРР}$ . Атропин, также, вызывает уменьшение  $ИЧ_{БРР}$  как у животных контрольной группы, так и у животных с ЛАГ (Табл. 4.2.4).

Наибольшим изменением ЧСС покоя (от  $309.1 \pm 6.9 [295.3; 322.9]$  до  $394.9 \pm 12.0 [371.0; 418.8]$  уд/мин,  $85.7$  уд/мин),  $ЧСС_{min}$  (от  $207.8 \pm 17.7 [173.1; 242.5]$  до  $333.0 \pm 17.6 [298.5; 367.4]$  уд/мин,  $125.18$  уд/мин),  $БК_{БРР}$  и  $A_{БРР}$ , вызванное действием атропина, обнаруживается у контрольных животных через 4 нед после начала эксперимента (рис. 5а, панель «4-я нед/контроль»); у животных с ЛАГ атропин приводит к значимо меньшему изменению  $ЧСС_{min}$ ,  $БК_{БРР}$  и  $A_{БРР}$  ( $p < 0,05$ ), чем у крыс контрольной группы на 4-ю нед (рис 4.2.3, Табл. 4.2.4,  $\Delta A_{БРР}$ ).

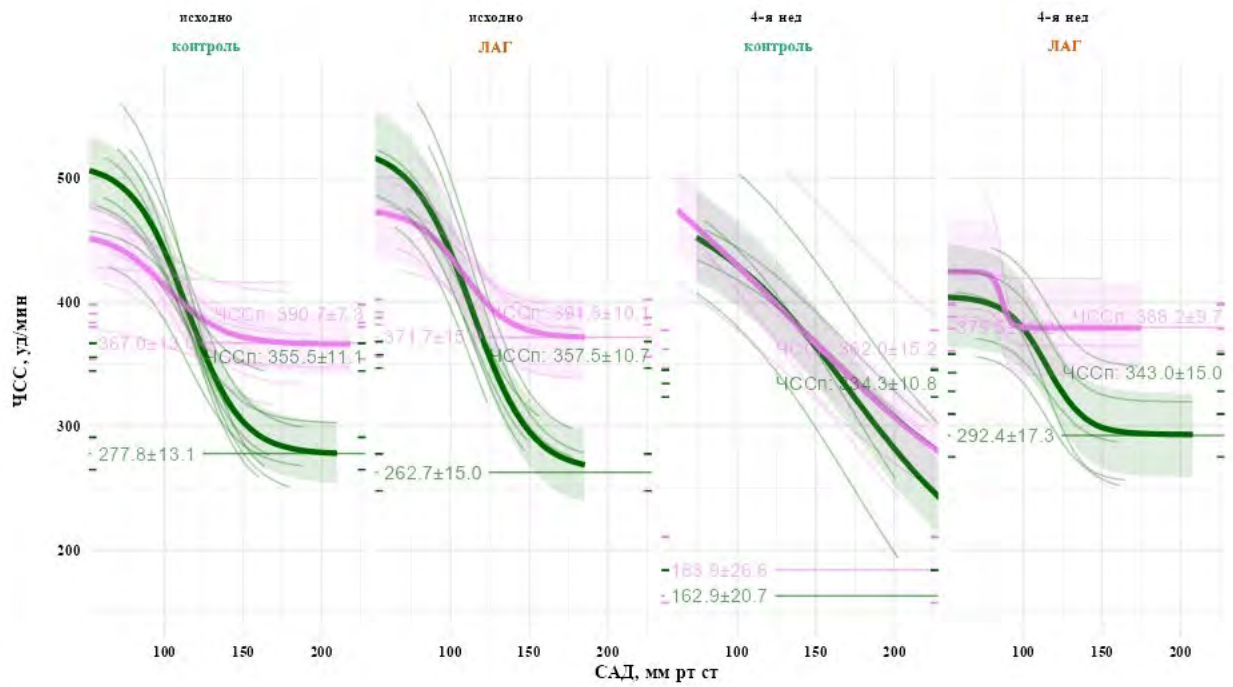


**Рис. 4.2.3** Влияние ЛАГ на холинергическую составляющую барорецепторного контроля ЧСС. Кривые барорецепторной реакции показаны для контрольной группы крыс («контроль») на момент начала и через 4 нед после начала экспериментов; для группы животных до введения («исходно/ЛАГ») и через 4 нед после введения МКТ («4-я нед/ЛАГ»). Для каждой группы и временной точки показаны кривые БРР, полученные в стандартных условиях (зеленый), а также после введения атропина (розовый). На рисунке представлены только минимально достижимая ЧСС и ЧСС покоя. Обозначения групповых средних, дов. интервалов, индивидуальных предсказаний, а также отметки на краях панелей для параметров, ЧСС покоя и масштаб панелей такие же как на предыдущих рисунках.

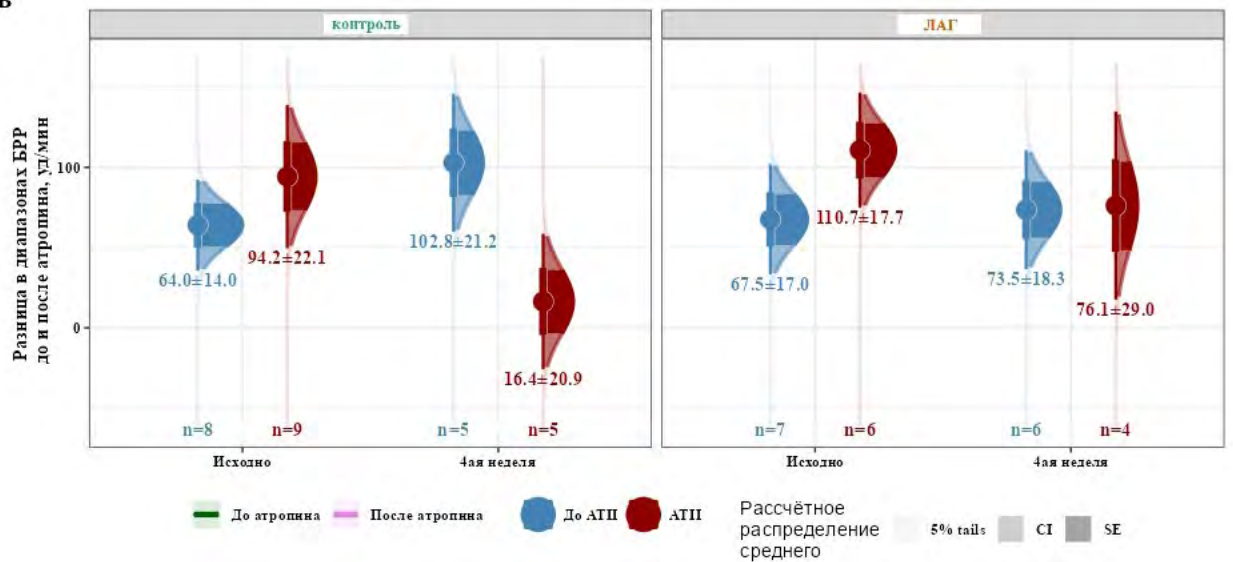
#### **IV.2.4 Влияние АТII на парасимпатический компонент барорецепторного рефлекса при ЛАГ**

В контрольных условиях АТII оказывает незначительное влияние на изменения параметров барорецепторной реакции, вызываемые атропином (рис. 4.2.4 А, панели «исходно»). В контрольной группе, через 4 нед после начала эксперимента при действии атропина на фоне инфузии АТII наблюдается незначительное изменение ЧСС покоя (от  $334.3 \pm 10.8 [312.8; 355.9]$  до  $362.0 \pm 15.2 [331.8; 392.2]$  уд/мин, 27 уд/мин) и ЧСС<sub>min</sub> (от  $162.9 \pm 20.7 [122.3; 203.4]$  до  $183.9 \pm 26.6 [131.7; 236.1]$  уд/мин, 21 уд/мин), а также лишь небольшое ослабление БК<sub>БРР</sub> и снижение А<sub>БРР</sub> ( $16.4 \pm 28$  уд/мин на фоне инфузии АТII и  $102.8 \pm 21.2$  уд/мин без АТII, рис. 4.2.4 Б, панель «контроль»). Таких эффектов не наблюдается у животных с ЛАГ (рис. 4.2.4 Б, панель «ЛАГ») – вызываемое атропином повышение ЧСС<sub>min</sub>, ослабление БК<sub>БРР</sub> и А<sub>БРР</sub> сохраняется (Табл. 4.2.4).

А



Б



**Рис 4.2.4** Влияние АТП на парасимпатический компонент барорецепторного контроля ЧСС при ЛАГ  
**А.** Кривые барорецепторной реакции показаны для контрольной группы крыс, группы животных до введения («исходно») и через 4 нед после введения монокроталина («ЛАГ»). Розовым цветом показаны кривые БРР, регистрируемые на фоне инфузии АТП, **Б.** Разница в величине диапазона БРР ( $\Delta\Delta_{БРР}$ ), определяемого до и после введения атропина для контрольных животных (левая панель) и животных, получавших МКТ («ЛАГ», правая панель). Красным цветом показана разница в величине диапазона БРР, регистрируемая на фоне инфузии АТП. Обозначения, дов. интервалов, ошибок среднего, плотностей распределения и описательных статистик такие же, как на рис 4.2.2. На панелях приведены средние значения  $\pm$  ст.ош.ср для каждой группы.

период экспер-та	исходно		4-я неделя	
	контроль (атропин)	ЛАГ (перед введением МКТ) (атропин)	контроль (атропин)	ЛАГ (4 нед после вв-ния МКТ) (атропин)
ЧСС покоя	353.1±8.0[337.2;369.0] <b>(385.3±12.1[361.2;409.4])</b>	352.5±6.9[338.8;366.2] <b>(404.2±11.0[382.4;426.0])</b>	309.1±6.9[295.3;322.9] <b>(394.9±12.0[371.0;418.8])</b>	344.7±15.1[314.6;374.8] <b>(390.3±13.1[364.3;416.3])</b>
ЧСС покоя: АТII	355.5±11.1[333.4;377.7] <b>(390.7±7.3[376.2;405.3])</b>	357.5±10.7[336.1;378.8] <b>(391.8±10.1[371.8;411.9])</b>	334.3±10.8[312.8;355.9] <b>(362.0±15.2[331.8;392.2])</b>	343.0±15.0[313.2;372.8] <b>(388.2±9.7[368.9;407.5])</b>
ЧСС <sub>min</sub>	289.5±13.7[262.6;316.4] <b>(339.3±14.0[311.8;366.8])</b>	301.8±14.7[273.0;330.7] <b>(373.8±14.8[344.7;402.8])</b>	207.8±17.7[173.1;242.5] <b>(333.0±17.6[298.5;367.4])</b>	258.7±14.9[229.4;288.0] <b>(359.1±15.9[327.9;390.2])</b>
ЧСС <sub>min</sub> : АТII	277.8±13.1[252.2;303.4] <b>(367.0±13.0[341.5;392.5])</b>	262.7±15.0[233.3;292.0] <b>(371.7±15.9[340.6;402.7])</b>	162.9±20.7[122.3;203.4] <b>(183.9±26.6[131.7;236.1])</b>	292.4±17.3[258.5;326.3] <b>(379.5±19.2[342.0;417.1])</b>
ИЧ <sub>БРР</sub>	5.2±1.1[3.4;7.9] <b>(1.7±0.3[1.2;2.4])</b>	3.6±0.4[2.9;4.4] <b>(2.4±0.4[1.7;3.2])</b>	3.5±0.3[3.0;4.2] <b>(1.8±0.1[1.6;2.0])</b>	2.0±0.3[1.5;2.7] <b>(1.4±0.1[1.2;1.7])</b>
ИЧ <sub>БРР</sub> : АТII	4.0±0.8[2.8;5.9] <b>(1.7±0.3[1.2;2.5])</b>	5.3±1.1[3.5;8.0] <b>(2.3±0.4[1.7;3.2])</b>	2.4±0.3[1.9;2.9] <b>(1.9±0.1[1.7;2.1])</b>	2.7±0.6[1.8;4.2] <b>(0.7±0.1[0.5;1.0])</b>
ΔА <sub>БРР</sub>	<b>64.0±14.0[35.7;92.3]</b>	<b>67.5±17.0[33.3;101.8]</b>	<b>102.8±21.2[59.9;145.7]</b>	<b>73.5±18.3[36.5;110.4]</b>
ΔА <sub>БРР</sub> : АТII	<b>94.2±22.1[49.7;138.7]</b>	<b>110.7±17.7[75.0;146.4]</b>	<b>16.4±20.9[-25.7;58.5]</b>	<b>76.1±29.0[17.6;134.6]</b>
n(п <sub>атр</sub> )	8(8)	7(7)	5(5)	7(6)
n <sub>АТII</sub> (n <sub>АТII+атр</sub> )	9(9)	7(6)	5(5)	5(4)

**Табл. 4.2.2** Характеристические значения ЧСС и параметров барорецепторной реакции в группе контрольных животных (контроль), а также в группе животных, сформировавших к 4-й неделе признаки ЛАГ (правая колонка) на фоне атропина. Значения параметров приведены на момент начала эксперимента («исходно», левые колонки) и к моменту окончания 4-й недели эксперимента («4-я неделя», правые колонки). В нижней части каждой графы для каждой группы приведены значения ЧСС и параметры барорецепторной реакции, получаемые на фоне атропина и инфузии ангиотензина II (АТII). Обозначения такие же, как и в Табл. 1, за исключением ΔА<sub>БРР</sub>, обозначающей разницу между диапазонами БРР до и после атропина. Для возможности сопоставления в верхней строке каждой ячейки приведены значения параметра, определяемые до введения животным атропина (выделено курсивом). В нижней строке каждой ячейки в круглых скобках жирным шрифтом приведены значения параметра, определяемые на фоне атропина.

n<sub>атр</sub> – количество животных, получавших атропин.

Данные представлены как среднее±ст.ош.ср.[нпДИ;впДИ]

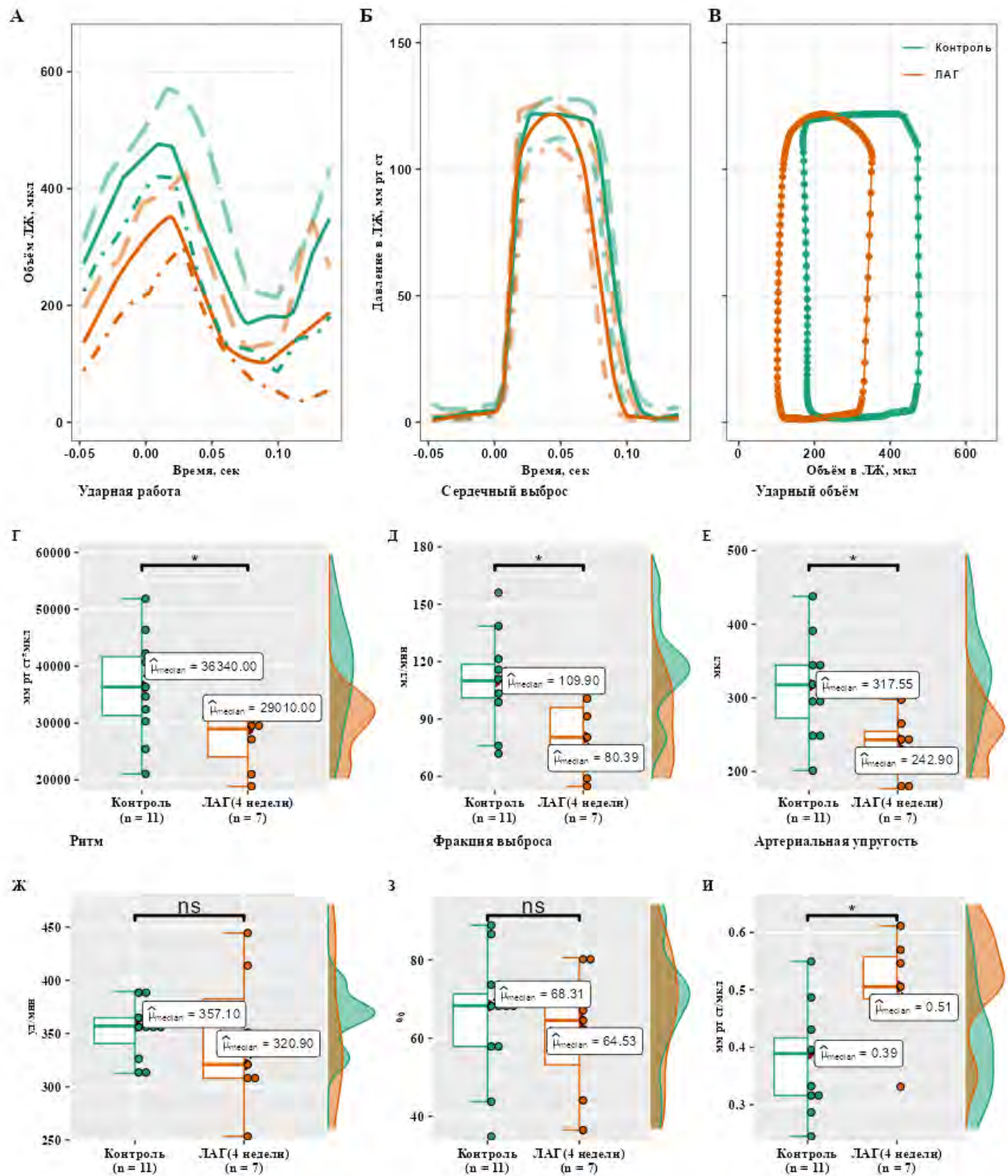
### IV.3 Сократимость левожелудочкового миокарда при ЛАГ

#### IV.3.1 Влияние ЛАГ на давление, объём и показатели производительности ЛЖ

У крыс с ЛАГ давление в левом желудочке не отличается от давления у контрольной группы на протяжении всего кардиоцикла (рис 4.3.1. Б). Однако, медианный фазовый портрет ЛЖ для группы ЛАГ оказывается сдвинут в сторону меньших значений объемов (влево) относительно такового для контрольной группы (рис 4.3.1. В). Медианные значения объема ЛЖ для группы ЛАГ существенно меньше таковых в контрольной группе на протяжении всего кардиоцикла, но наибольшие различия выявляются в период диастолы, соответствующий активной фазе наполнения ЛЖ. В этот период значение верхнего квартиля (Q3) для объема ЛЖ группы ЛАГ не достигает нижнего квартиля (Q1) контрольной группы: медианный объем ЛЖ в группе ЛАГ составляет 64.5% (49.6%;74.5%, n=7) относительно контрольной группы (рис 4.3.1. А). Сдвиг фазового портрета ЛЖ (рис 4.3.1. В) у крыс с ЛАГ обусловлен неравным снижением как КДО (на 136 мкл или 28%), так и КСО (на 54 мкл или 33.1%).

У крыс с ЛАГ наблюдается снижение показателей, характеризующих насосную функцию левого желудочка. В частности, через 5 нед после введения МКТ значимо ( $p<0,02$ ) уменьшается ударная работа (на 20.1%, n=7, рис 4.3.1. Г), сердечный выброс (на 26.8%, n=7, рис 4.3.1. Д) и ударный объем (на 23.5%, n=7, рис 4.3.1. Е) по сравнению с показателями у животных контрольной группы (n=10).

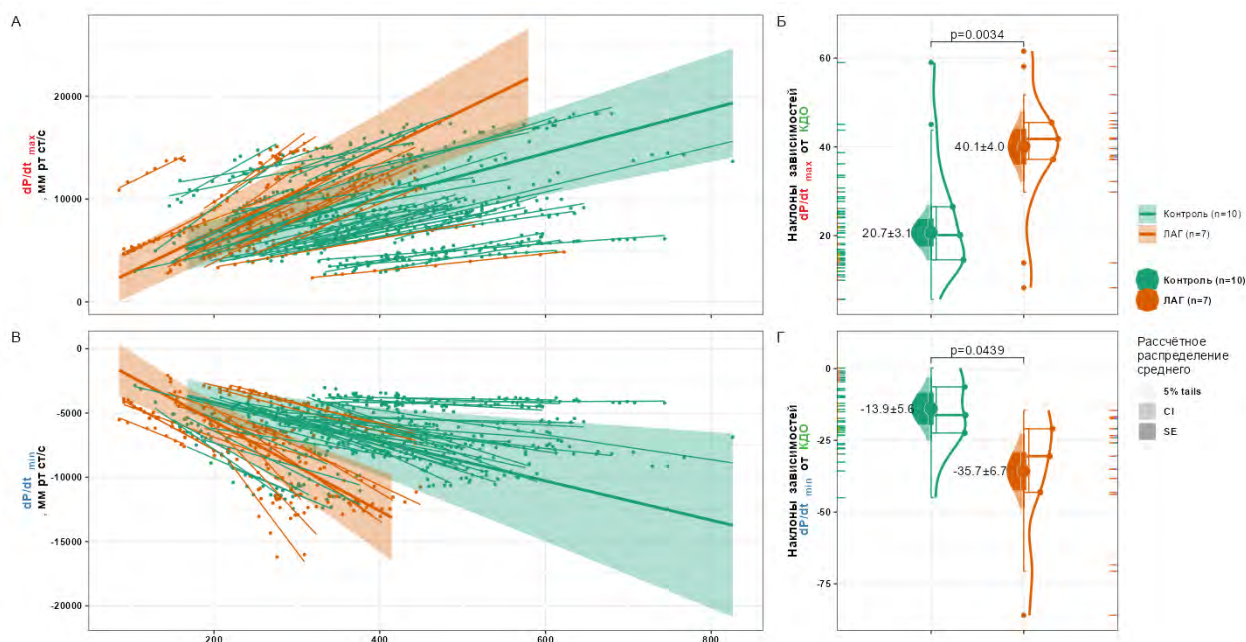
Фракция выброса (n=7,  $p>0,3$ , рис 4.3.1. Ж), как и ЧСС (n=7,  $p>0,6$ , рис 4.3.1. З) у крыс с ЛАГ не отличаются от значений животных контрольной группы. Артериальная упругость у крыс через 5 нед после введения МКТ оказывается значимо больше (на 29.9%, n=7,  $p<0,02$ , рис 4.3.1. И), чем у контрольных животных, за счет снижения УО.



**Рис.4.3.1.** Кривые давление-объем, а также индексы сердечной производительности и артериальная упругость для левого желудочка контрольных крыс и крыс с ЛАГ. **А-В.** Индивидуальные кривые (левые и средние панели) и медианные (сплошная линия) значения давления (верхние панели) и объема (нижние панели) левого желудочка контрольных крыс и крыс с ЛАГ. Индивидуальные фазовые портреты для левого желудочка в координатах «давление-объем» показаны на вставках верхних панелей. **Г-И.** Ударная работа, сердечный выброс, ударный объем, ритм (ЧСС, уд/мин), фракция выброса для левого желудочка, артериальная упругость контрольных крыс и крыс с ЛАГ. Кумулятивные плотности распределения для групп показаны справа от каждой панели в виде оранжевых (ЛАГ) и зеленых (контроль) областей со сплошной заливкой. « $W_{\text{Mann-Whitney}}$ » - сумма рангов для групп, \* -  $p < 0,05$  (U-тест, относительно контроля), « $\mu_{\text{median}}$ » – точное значение медианы для каждой группы, ns – незначимо. ЛЖ – левый желудочек.

### IV.3.2 Влияние преднагрузки на скорость сокращения и расслабления ЛЖ при ЛАГ

У контрольных животных и животных с ЛАГ проводили окклюзионные тесты, в ходе которых рассчитывали  $dP/dt_{max}$  и  $dP/dt_{min}$  для каждого в серии различного значения КДО. Аппроксимированные регрессионные линейные зависимости « $dP/dt$ -КДО» для группы ЛАГ сдвинуты влево и имеют значимо больший наклон по сравнению с таковыми для контрольной группы животных (рис 4.3.2 А, В). Коэффициент наклона для кривой  $dP/dt_{max}$ -КДО, характеризующий зависимость сократимости ЛЖ от преднагрузки, составил  $40.07 \pm 4.04$ ; [32.14, 47.99] мм рт ст/с\*мкл для группы ЛАГ, в то время как для контрольной группы -  $20.68 \pm 3.13$ ; [14.54, 26.82] мм рт ст/с\*мкл ( $p < 0,005$ ). Т.е. ЛАГ вызывает увеличение коэффициента наклона почти в два раза (1.93) (рис. 4.3.2 Б). Коэффициент наклона для кривой  $dP/dt_{min}$ -КДО, характеризующий зависимость скорости активного расслабления от преднагрузки, составил  $-35.70 \pm 6.65$ ; [-48.74, -22.67] и  $-13.9 \pm 5.6$ ; [-24.88, -2.92] мм рт ст/с\*мкл для животных с ЛАГ и животных контрольной группы (увеличение более чем в 2.5 раза, ( $p < 0,05$ ), (рис. 4.3.2 Г). Таким образом, индукция у крыс ЛАГ приводит к усилению зависимости сократимости и «интенсивности» расслабления левого желудочка от его наполнения. На системном уровне, наблюдаемое усиление активации миокарда растяжением (преднагрузкой) можно интерпретировать как компенсаторное, направленное на поддержание сердечного выброса при хроническом снижении КДО, УО и неизменной ЧСС.



**Рис 4.3.2** Зависимости скорости сокращения и расслабления левого желудочка от конечно-диастолического объема (КДО) у контрольных крыс (зеленые точки и кривые) и крыс с ЛАГ (оранжевые точки и кривые). **А** и **В**. Индивидуальные значения  $dP/dt_{max}$  и  $dP/dt_{min}$  показаны зелеными и оранжевыми точками. Регрессия для каждого окклюзионного теста показана оранжевым или зеленым отрезком. Аппроксимированные групповые зависимости максимальной скорости сокращения (**А**) или расслабления (**В**) показаны жирными линиями для контрольных животных (зеленый) и животных с ЛАГ (оранжевый).

**Б** и **Г**. Коэффициенты наклона для линейных зависимостей, характеризующих максимальную скорость сокращения (**Б**) и наибольшую скорость расслабления (**Г**) левого желудочка у контрольных крыс (*зеленый*) и крыс с ЛАГ (*оранжевый*). Точные значения  $p$  показаны на рисунках (t-тест). CI и SE – доверительный интервал и ошибка среднего (показаны интенсивностью цвета). Кумулятивные плотности распределения для групп показаны справа в виде оранжевых (ЛАГ) и зеленых (контроль) огибающих контуров.

#### **IV.4 Гипоксическая вазоконстрикторная реакция в малом круге кровообращения при ЛАГ**

##### **IV.4.1 Гипоксическая вазоконстрикторная реакция в малом круге кровообращения при ЛАГ в исследованиях на УЗИ в хроническом эксперименте**

В контрольных условиях и при действии АТ-II динамика КДО у здоровых крыс оказывается различной: у здоровых крыс в начальный момент транзиторной гипоксии КДО снижается на 10% от исходного уровня (с  $451 \pm 87.5$  до  $407.8 \pm 83.3$  мкл); по окончании транзиторной гипоксии спустя 1 мин нормоксии восстановления не происходит – КДО остаётся на уровне  $412 \pm 14.8$  мкл, что составляет 91% от его исходных значений (рис 4.4.1 А.1). В начальный момент транзиторной гипоксии на фоне АТ-II у здоровых животных наблюдается резкое увеличение КДО (от  $392 \pm 56.3$  до  $465.2 \pm 30.1$  мкл) - на 19% от исходного уровня. К концу гипоксического теста КДО уменьшается от  $465.2 \pm 30.1$  мкл до  $415.5 \pm 61$  мкл, но всё ещё остаётся на 6% выше контрольного значения. По окончании транзиторной гипоксии спустя 1 мин нормоксии на фоне АТ-II КДО снижается до  $370 \pm 99.3$  мкл, что на 5% ниже контрольного уровня (рис 4.4.1 Б.1). Таким образом, у здоровых крыс транзиторная гипоксия вызывает снижение КДО; на фоне АТ-II КДО не реагирует снижением в ответ на транзиторную гипоксию.

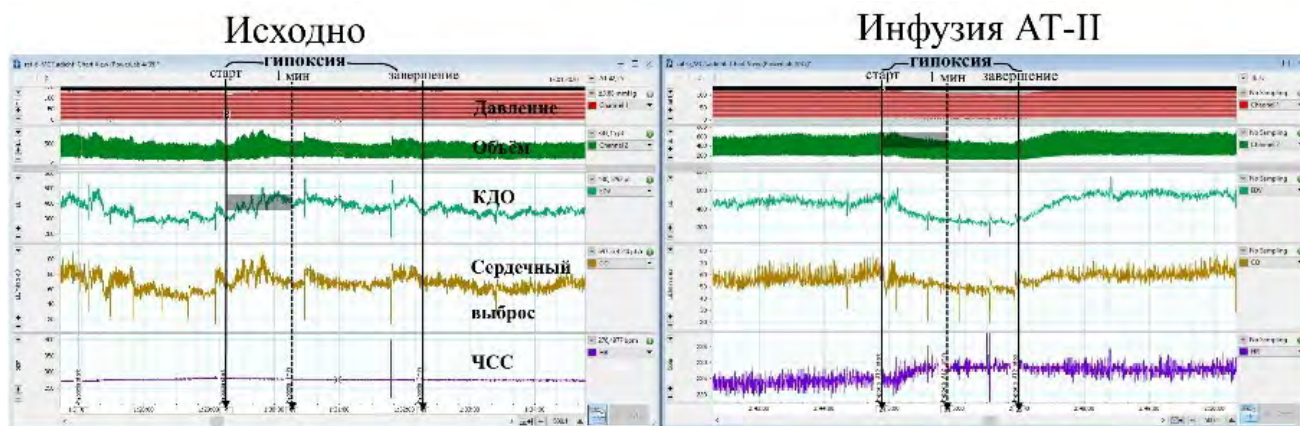
Транзиторная гипоксия вызывает различные изменения КДО у здоровых крыс и крыс с ЛАГ на разных стадиях после инъекции МКТ. На вторую неделю после индукции ЛАГ падение КДО в начальный момент гипоксического теста оказывается более выраженным - от  $456 \pm 65.2$  до  $396.7 \pm 31.9$  мкл;  $p=0.03 < 0,05$ ) и составляет 13% (рис 4.4.1 А.2). К моменту окончания гипоксического теста КДО увеличивается до  $404.5 \pm 20$  мкл, а через минуту нормоксии возвращается к исходному уровню, достигая  $459 \pm 26.7$  мкл ( $p=0.0049$ ). В противоположность здоровым животным, на фоне АТ-II падение КДО у крыс с ЛАГ в ответ на гипоксию сохраняется, хоть и является менее выраженным: от  $461 \pm 22.2$  до  $416.3 \pm 50.7$  мкл (10% от исходного уровня) в начале транзиторной гипоксии (рис 4.4.1 Б.2). К моменту окончания гипоксического теста КДО составляет  $439.2 \pm 49.9$  мкл, а за минуту нормоксии КДО вновь снижается до  $392 \pm 44.5$  мкл (10% от исходного уровня).

Через 4 нед. после индукции ЛАГ у крыс в ответ на гипоксию наблюдается стабильный рост КДО – от  $419.5 \pm 147.5$  до  $426.6 \pm 81.4$  мкл в начале гипоксического теста. К моменту окончания транзиторной гипоксии КДО составлял  $458.5 \pm 125.8$  мкл (на 9% выше исходного уровня, рис 4.4.1 А.3). Спустя минуту нормоксии КДО снижается до  $430.5 \pm 64.5$  мкл.

На фоне АТ-II через 4 нед, как и спустя 2 нед после введения МКТ воспроизводятся реакция снижения КДО в ответ на гипоксию: от  $453 \pm 126$  мкл до  $393 \pm 113.4$  мкл в момент, соответствующий началу гипоксического теста, и  $407.3 \pm 84$  мкл в момент окончания

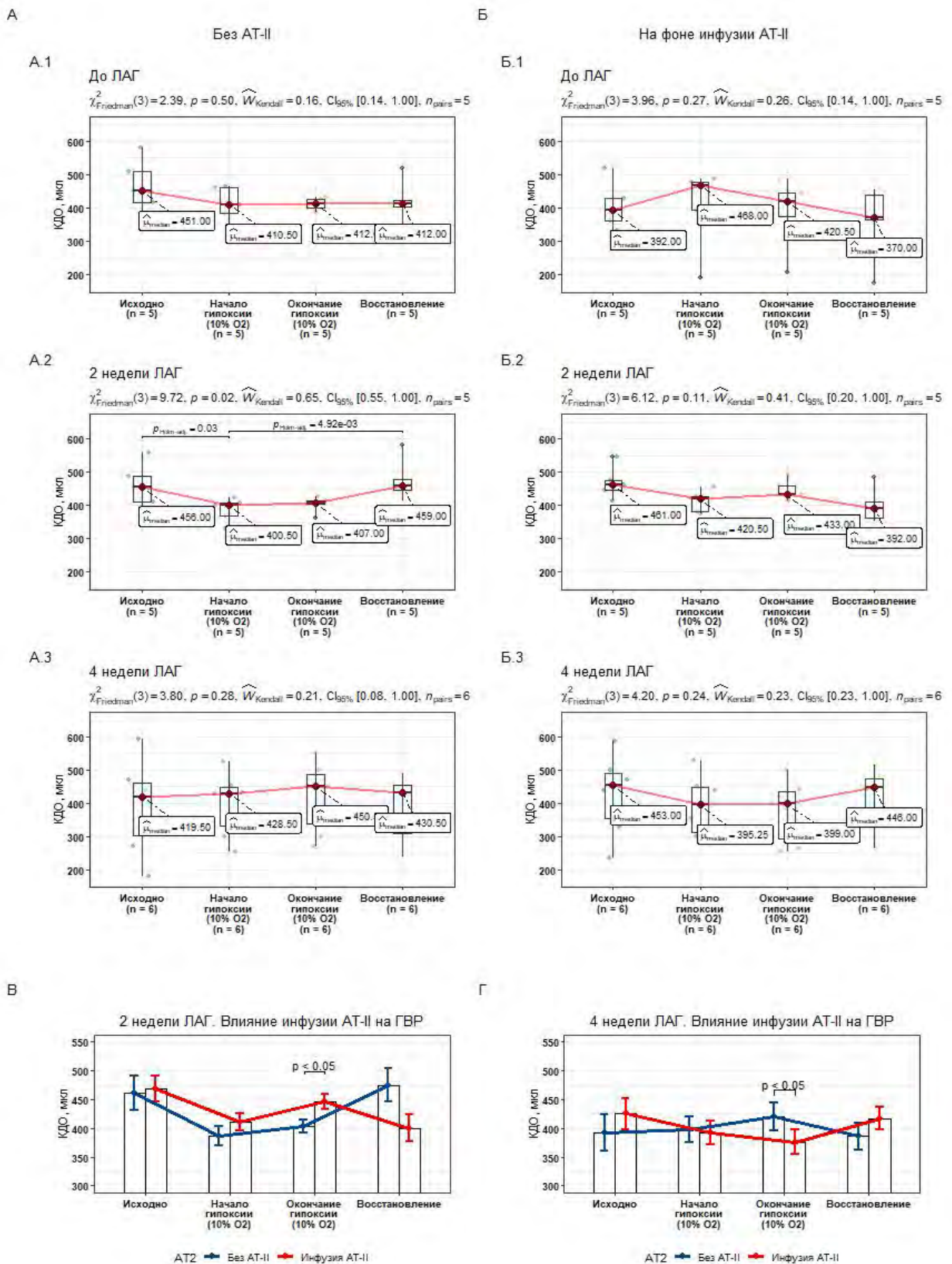
гипоксии (рис 4.4.1 Б.3). Более того, через минуту нормоксии КДО почти возвращается к исходным значениям ( $446 \pm 75.6$  мкл). Реакция КДО на транзиторную гипоксию на фоне инфузии АТ-II статистически значимо ( $p < 0,05$ ) снижена на момент окончания гипоксии для крыс на второй неделе ЛАГ (рис 4.4.1 В ) и статистически значимо ( $p < 0,05$ ) увеличена для тех же крыс на четвёртой неделе ЛАГ (рис 4.4.1 Г). Таким образом, на четвёртую неделю ЛАГ у крыс исчезает реакция снижения КДО в ответ на транзиторную гипоксию, но на фоне инфузии АТ-II она частично восстанавливается.

Парадоксальную реакцию восстановления ГВР на фоне инфузии АТ-II удалось зарегистрировать в пилотных экспериментах с катетеризацией ЛЖ PV-катетером. Влияние АТ-II на КДО у крыс через 4 нед после индукции ЛАГ подтверждаются при прямом измерении конечно-диастолического объема с помощью внутрижелудочковой катетеризации: с  $449 \pm 25.8$  мкл до  $347 \pm 37.1$  мкл. На рис. 4.4.2 приведена репрезентативная запись прямой регистрации КДО при транзиторном гипоксическом тесте в контроле и на фоне АТ-II. Исходно, транзиторная гипоксия не сопровождается падением КДО, тогда как на фоне инфузии АТ-II это падение отчётливо.



**Рис. 4.4.2** Репрезентативная запись давления и объёма в левом желудочке во время транзиторной гипоксии от крысы на четвёртой неделе ЛАГ без инфузии АТ-II и на её фоне. Пунктиром отмечена длительность транзиторной гипоксии в экспериментах с использованием эхокардиографии. КДО – конечно-диастолический объём. ЧСС – частота сердечных сокращений.

Эти данные поставили вопрос подтверждения феномена восстановления ГВР на фоне инфузии АТ-II у крыс, имеющих сформированную ЛАГ.



**Рис. 4.4.1** Реакция КДО на транзиторную гипоксию. Панель А - без АТ-II, панель Б - на фоне инфузии АТ-II. Номерами обозначены последовательные временные точки: А.1/Б.1 – исходно, до ЛАГ, А.2/Б.2 – 2 недели ЛАГ, А.3/Б.3 – 4 недели ЛАГ. Графики даны с одинаковым масштабом по оси у. В – влияние инфузии АТ-II на изменения КДО в ответ на транзиторную гипоксию на второй неделе ЛАГ. Г - влияние инфузии АТ-II на изменения КДО в ответ на транзиторную гипоксию на четвёртой неделе ЛАГ

#### **IV.4.2 Исследование динамики гипоксической вазоконстрикторной реакции в малом круге кровообращения при зрелой ЛАГ с измерением объема ЛЖ при помощи тетраполярной импедансографии**

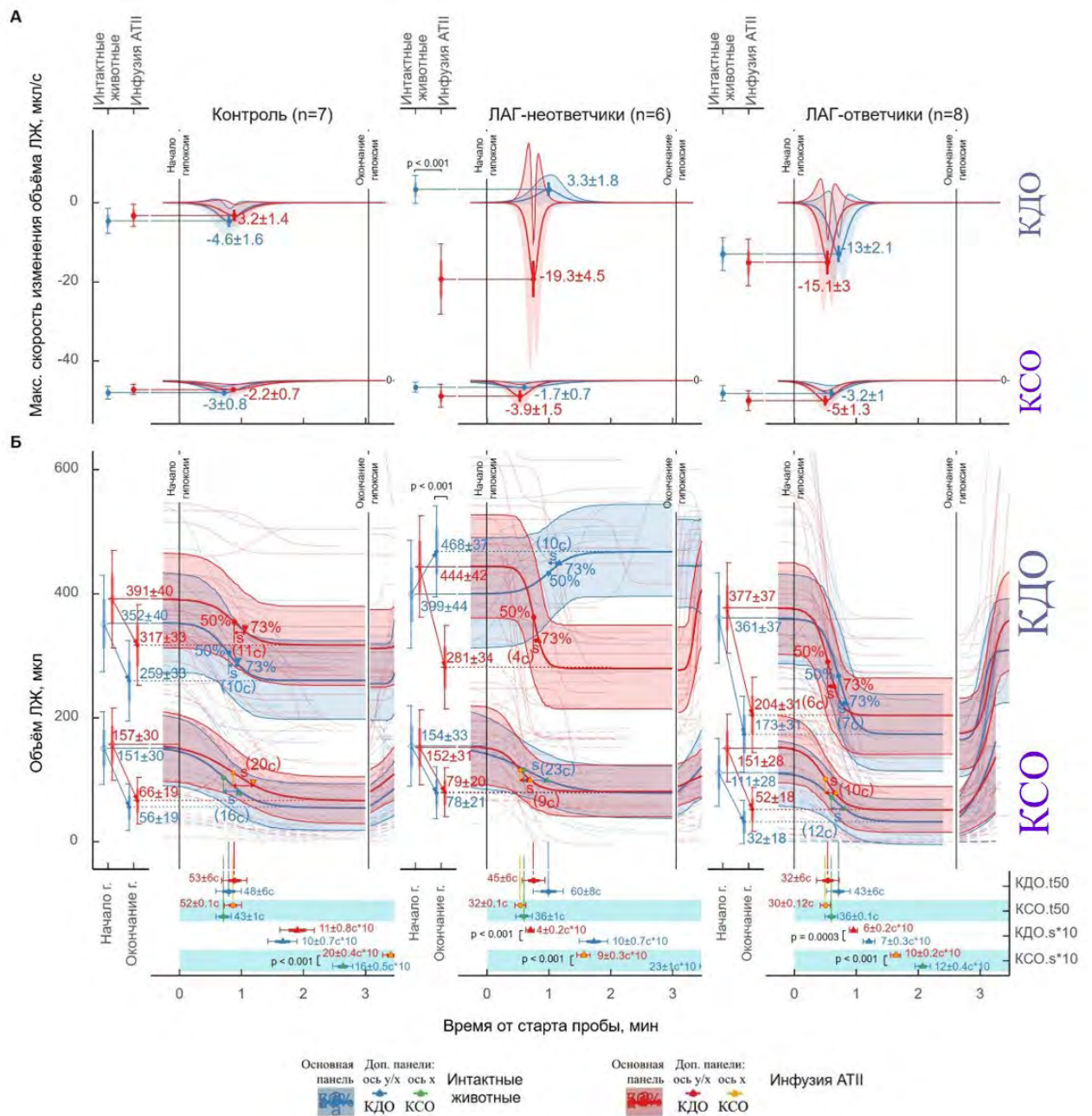
Исследование ГВР у серии крыс на стадии зрелой ЛАГ и действия на неё АТII выявило существование внутри группы ЛАГ-крыс двух подгрупп: в одной подгруппе («ЛАГ-неотвечки») воспроизвёлся феномен отсутствия ГВР во время гипоксической пробы (рис 4.4.3 Б), в то время как другая подгруппа («ЛАГ-отвечки») сохранила ГВР. Средний КДО перед гипоксической пробой почти одинаков у контрольных крыс и ЛАГ-крыс «отвечиков» ( $352\pm 40$  мкл и  $361\pm 37$  мкл, соответственно), тогда как у «ЛАГ-неотвечиков» средний КДО исходно на 50 мкл больше и составляет  $399\pm 44$  мкл. Инфузия АТII приводит к увеличению среднего КДО перед гипоксической пробой у всех групп крыс на 39 мкл и 45 мкл в контроле и в группе «ЛАГ-неотвечиков», и на 16 мкл в группе «ЛАГ-отвечиков». Средний КСО практически идентичен в контрольной группе и группе «ЛАГ-неотвечиков» и мало меняется при инфузии АТII, тогда как в группе «ЛАГ-отвечиков» средний КСО исходно ниже, чем в остальных группах, но при инфузии АТII вырастает до уровня остальных (рис 4.4.3 Б, 4.4.4 А).

В наших экспериментах КДО – это основной показатель-индикатор ГВР. PV-катетер позволяет поударно определять данный объём в реальном времени, что делает возможным ранее недоступное описание динамики развития ГВР у целого животного. КДО в ответ на гипоксическую пробу снижается в двух группах (рис 4.4.3 Б и 4.4.4 А) – контрольной группе (с  $352\pm 40$  мкл до  $259\pm 33$  мкл, т.е. на 93 мкл(22%)) и группе «ЛАГ-отвечиков» (с  $361\pm 37$  мкл до  $173\pm 31$  мкл, т.е. на 188 мкл(52%)). В группе «ЛАГ-отвечиков» не только амплитуда снижения КДО в два раза выше, чем в контроле, но также минимум производной вдвое превосходит таковой в контроле ( $-13\pm 2,1$  мкл/с vs.  $-4,6\pm 1,6$  мкл/с в контрольной группе), и, соответственно,  $s$  (время снижения КДО с 50% до 73%) тоже меньше, чем в контроле -  $7,2\pm 0,3$  с vs.  $10\pm 0,7$  с в контрольной группе (рис 4.4.3 А и 4.4.4 В). В тоже время полуснижения КДО отреагировало слабо, уменьшившись в пределах ошибки среднего –  $47,6\pm 6,2$  с в контроле vs.  $42,8\pm 5,7$  с в группе «ЛАГ-отвечиков». В противоположность ранее описанным группам «ЛАГ-неотвечки» реагируют на гипоксическую пробу увеличением КДО на 65 мкл (16%) с  $399\pm 44$  мкл до  $464\pm 37$  мкл (рис 4.4.3 Б) с наибольшим временем полуувеличения  $t_{50}$  среди всех групп –  $59,5\pm 5,6$  с (рис 4.4.3 Б и 4.4.4 Б).

Инфузия АТII действует противонаправленно на контрольную группу и группы ЛАГ, при этом меняя характер реакции КДО у группы «ЛАГ-неотвечиков» на противоположенный – с инфузией АТII у них восстанавливается ГВР; таким образом на фоне инфузии АТII снижение КДО происходит во всех экспериментальных группах. АТII увеличивает время полуспада КДО ( $t_{50}$ ) при гипоксической пробе с  $47,6\pm 6,2$  с до  $53,1\pm 6,3$  с

при АТII, а также время спада КСО с 50% до 73% (s) с  $10 \pm 0,7$  до  $11,4 \pm 0,8$  при АТII в контрольной группе (рис 4.4.3 Б и 4.4.4 Б, В). В группах с ЛАГ при гипоксической пробе на фоне инфузии АТII временные показатели, наоборот, уменьшаются: t50 падает с  $59,5 \pm 7,6$  с до  $45,2 \pm 5,8$  с при АТII в группе «ЛАГ-неответчики», и с  $42,8 \pm 5,7$  с до  $32,3 \pm 5,6$  с при АТII в группе «ЛАГ-ответчики», s уменьшается в два раза - с  $10,3 \pm 0,7$  с до  $4,2 \pm 0,2$  с при АТII в группе «ЛАГ-неответчики», и с  $7,2 \pm 0,3$  с до  $5,7 \pm 0,2$  с при АТII в группе «ЛАГ-ответчики» (рис 4.4.3 Б и 4.4.4 Б, В). Такое противонаправленное действие АТII приводит к статистически высоко значимым различиям (рис 4.4.4 Б, В). Противонаправленное действие АТII на контрольную и обе ЛАГ-группы наблюдается и на уровне непосредственно производных (рис 4.4.4 А), абсолютные значения которых выросли в группах ЛАГ при АТII и уменьшились в контроле – на фоне инфузии АТII самая высокая скорость спада КДО у группы «ЛАГ-неответчиков» -  $-19,3 \pm 4,5$  мкл/с. Сам же спад КДО у этой группы во время пробы на фоне АТII составляет 163 мкл или 36%.

На гипоксическую пробу все экспериментальные группы реагируют снижением КСО (на 49% «ЛАГ-неответчики», на 68% «ЛАГ-ответчики», на 63% контроль), которое происходит быстрее в группах ЛАГ, чем в контроле ( $35,6 \pm 4,5$  «ЛАГ-неответчики» и  $35,9 \pm 3,8$  «ЛАГ-ответчики» vs.  $42,6 \pm 4,9$  с в контроле; рис 4.4.3 Б и 4.4.4 Б). АТII уменьшает уровень падения КСО в результате гипоксической пробы на 10 мкл в контроле и на 20 мкл в группе «ЛАГ-ответчики», однако действует противоположенным образом на скорость снижения КСО при гипоксической пробе, тормозя его снижение в контроле (рис 4.4.3 Б и 4.4.4 Б, В; в контроле время снижения наполовину (t50) растёт с  $42,6 \pm 4,9$  с до  $51,7 \pm 4$  с, как и время дальнейшего снижения КСО с 50% до 73% (s) с  $15,8 \pm 0,5$  с до  $20,4 \pm 0,4$  с), тогда как в обеих группах ЛАГ интенсивность снижения КСО при гипоксической пробе на фоне инфузии АТII усиливается (t50 и s для обеих ЛАГ групп меньше на фоне инфузии АТII; рис 4.4.3 Б и 4.4.4 Б, В ). Противоположенное действие инфузии АТII на интенсивность снижения КСО при гипоксической пробе приводит к появлению статистически значимых различий в значениях t50 и s между контрольной группой и обеих групп ЛАГ (рис 4.4.4 Б, В). Наиболее выраженное и быстрое снижение КСО происходит в группе «ЛАГ-ответчики» (рис 4.4.3 Б и рис 4.4.4 Б, В) – это также видно по минимумам производных, которые для данной группы составляют -  $3,2 \pm 1$  мкл/с для гипоксической пробы и  $-5 \pm 1,3$  мкл/с для гипоксической пробы на фоне инфузии АТII (рис 4.4.3 А).



**Рис. 4.4.3** Показатели динамики объёма ЛЖ в начале и конце кардиоцикла во время гипоксической пробы в экспериментальных группах ( ) у интактных животных и на фоне инфузии АП II, **А**. Скорости изменения объёма ЛЖ ( $dV/dt$ ) в экспериментальных группах, линиями обозначены групповые средние значения (толстая линия) и верхняя граница ДИ. Максимальные абсолютные значения скорости подписаны на главных панелях и приведены со ст. ошибкой среднего. На соответствующих боковых мини-панелях они приведены вместе со ст. ошибкой и ДИ, **Б**. Динамика аппроксимированных логистической функцией показателей конечно-диастолического (КДО, верхние графики, подписаны справа серым) и конечно-систолического объёмов (КСО, нижние графики, подписаны справа фиолетовым) ЛЖ во время гипоксической пробы в контрольной группе и в обеих подгруппах ЛАГ (неответчики/ответчики) у интактных животных и на фоне инфузии АП II. Значения верхних и нижних асимптот логистических функций, которыми аппроксимировалось изменение КДО во время гипоксической пробы, в виде среднего±ст.ош.среднего и ДИ вынесены в вертикальные боковые мини-панели слева от основных панелей. Значения параметров логистической функции, имеющих интерпретацию на оси времени (времени достижения полуамплитуды ( $t_{50}$ ) и время изменения объёма с 50% до 73% амплитуды ( $s$ )), вынесены в горизонтальные мини-панели снизу. Графические элементы, представляющие  $s$ , ст.ош.ср и ДИ для  $s$ , откладывались по оси времени будучи умноженными на 10. Горизонтальные мини-панели снизу для временных параметров КСО имеют бирюзовый фон.

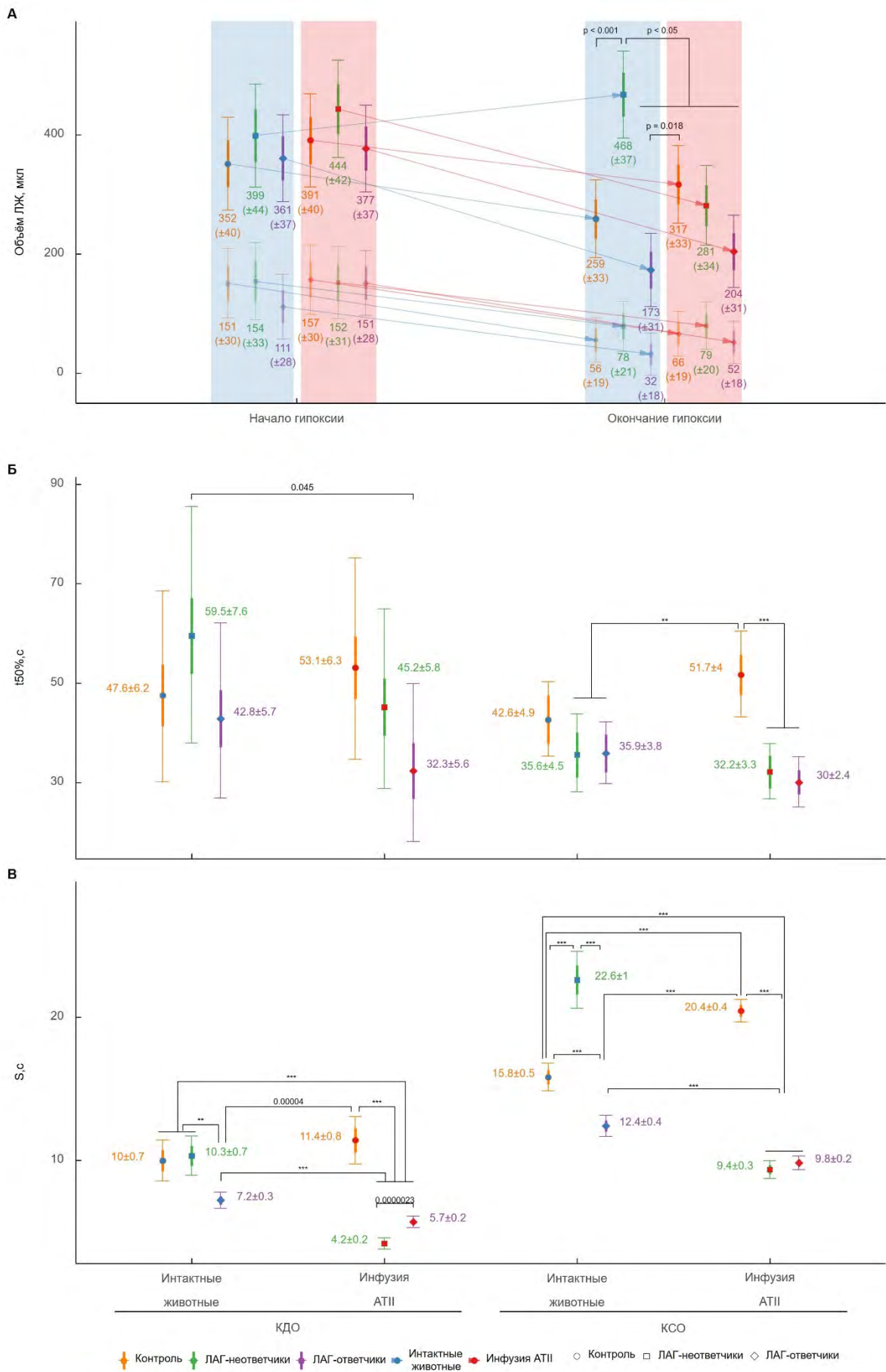


Рис. 4.4.4 Прямое сравнение параметров из рис 4.4.3 А. КСО и КДО ЛЖ у интактных крыс (внутри синих полос) и на фоне инфузии АП II (внутри красных полос), Б, В. Временные параметры (t50 и s)



Сердечный выброс. Б) Ударный объём. В) ЧСС. На рис. 4.4.5 А и 4.4.5 Б приведены результаты логистической аппроксимации с одновременной статистической оценкой параметров логистических кривых. Обозначения те же, что и на рис. 4.4.3 На рис. 4.4.5 В приведены результаты аппроксимации динамики ЧСС во время гипоксической пробы с помощью смешанного аддитивного моделирования (зависимость ритма от времени моделируется, как сумма линейно и нелинейно зависящих от времени компонент). Индивидуальные кривые моделируются, как отклонения от групповых средних. На дополнительной у-панели приведены линейные компоненты для групповых динамик ЧСС. Обозначения для средних, ст. ошибок среднего и ДИ такие же, как на рис 4.4.3

Динамика КДО и КСО определяет изменения ударного объёма во время гипоксической пробы в экспериментальных группах (рис 4.4.5 Б), который, в свою очередь, будет определять сердечный выброс (рис 4.4.5 А). При инфузии АТII сердечный выброс практически не меняется в контрольной группе, падает быстрее (но при этом с более низкого уровня) в группе «ЛАГ-ответчиков» (рис 4.4.5 А). Инфузия АТII переключает реакцию сердечного выброса в группе «ЛАГ-неответчиков» с роста на падение (рис 4.4.5 А).

ЧСС исходно ниже в группах ЛАГ, чем в контроле, при этом самая низкая исходная ЧСС в группе «ЛАГ-ответчиков» -  $327 \pm 9$  уд/мин (рис 4.4.5 В). Инфузия АТII во всех группах уменьшает ЧСС (рис 4.4.5 В). Разница в уменьшении ЧСС в ответ на инфузию АТII также падает у ЛАГ-групп и меньше всего она в группе «ЛАГ-ответчиков»  $16$  уд/мин ( $327 \pm 9$  уд/мин исходно vs.  $311 \pm 9$  уд/мин).

## IV.5. Транскриптомный профиль ткани выносящего тракта правого желудочка и устья легочного ствола при моделировании ЛАГ

### IV.5.1. Транскриптомный профиль тканей выводящего тракта правого желудочка и легочного ствола при моделировании ЛАГ

Экспериментальная легочная гипертензия приводит к существенному изменению транскриптомного профиля и изменению экспрессии множества генов. Для повышения наглядности и акцентирования на ключевых элементах, все дифференциальные гены (т.е. гены, экспрессия которых оказалась изменена при ЛАГ) разбиты на три категории: гены демонстрирующие высокую (>1000 rpkm), среднюю (>100, < 1000 rpkm) и низкую базовую экспрессию (>10, < 100 rpkm). Далее, последовательно дана характеристика всех трех категорий генов.

Среди генов, демонстрирующих высокую базовую экспрессию (>1000 rpkm) изменен уровень *Nupr1* (снижен) и *Pla2g2a* (увеличен) (Рис 4.5 А). Продукт гена *Nupr1* является белком, который подавляет пролиферацию и участвует в активации апоптоза, вызванного ДНК-повреждающим химическим стрессом. Продуктом гена *Pla2g2a* является одна из форм секретлируемой  $Ca^{2+}$ -зависимой фосфолипазы А2 (sPLA<sub>2</sub>). Фосфолипазы sPLA<sub>2</sub> имеют широкий спектр функций, в частности, эти ферменты вовлечены в процессы воспаления, антимикробной защиты и регенерации тканей. Экспрессия sPLA<sub>2</sub> снижается при гипертиреозе, и увеличивается при гипотиреозе [Sharma и др., 2014].

Дифференциальные гены, для которых характерен средний уровень базовой экспрессии при ЛАГ (от 100 до 1000 rpkm, рис 5 А) можно объединять в несколько групп в соответствии с их функциями (табл. 1). При моделировании ЛАГ повышена экспрессия генов, (1) контролирующих сократимость кардиомиоцитов, генов, (2) вовлеченных в термогенез, транспорт кислорода и клеточное дыхание, а также генов, участвующих в (3) метаболизме липидов и регуляции адипогенеза. При ЛАГ, наоборот, снижена экспрессия генов, относящихся к (1) трансляционной машине, генов, вовлеченных в (2) антиоксидантную защиту. При моделировании ЛАГ также обнаруживается, что подавлена экспрессия значительной части генов, участвующих в формировании иммунитета (3), а также генов, участвующих (4) в формировании миграционного и пролиферативного фенотипа среди неиммунных типов клеток.

Среди группы генов, демонстрирующих сниженную экспрессию и относящихся к трансляции, следует отметить *Rpl37* – ген рибосомного белка 37, входящего в состав большой субъединицы рибосомы. Продукт гена *Rpl37* является одним из белков, связывающихся с Mdm2 и MdmX и влияющих на стабильность транскрипционного фактора

p53 – ведущего блокатора клеточного цикла [Daftuar и др., 2013]. Снижение экспрессии *Rpl37* приводит к активации p53, подавлению пролиферации и запуску апоптоза [Llanos, Serrano, 2010]. Таким образом, ЛАГ, за счет *Rpl37* способствует усилению программируемой клеточной гибели.

Среди генов иммунного ответа снижена экспрессия *Bpifal* - гена антимикробного липид-связывающего пептида, обладающего высокой афинностью к фосфолипидам сурфактанта. Снижение экспрессии *Bpifal* ранее обнаружено как в животных моделях ЛАГ, индуцированных МКТ, так и при клинической картине ЛАГ [Juaiti и др., 2024].

Экспрессия нескольких генов, связанных с иммунным ответом, все же оказываются повышена при ЛАГ. Примером таких генов, являются ген хитиназы (*Chia*), эотаксина-1 (*Ccl11*) и *Vpreb3*. Эотаксин-1 является хемокином, продуцируемым активированными иммунными клетками, его секреция ассоциирована с ИЛ-3/4/10. Помимо иммунных клеток эотаксин-1 также продуцируется эндотелием и ГМК, что приводит к усилению признаков т.н. «миграционного фенотипа» в ГМК и эндотелиоцитах [Zhang и др., 2025]. Эотаксин-1 является аттарктантом эозинофилов и Т-хелперов-2 [Ahmadi и др., 2016]. *Vpreb3* – молекула-шаперон предшественников (пре-В-клетки), а также некоторых популяций зрелых лимфоцитов В-типа, которая участвует в сборке суррогатной лёгкой цепи пре-BCR, связываясь с лёгкими цепями иммуноглобулинов [Rosnet и др., 1999] [Rodig и др., 2010]. *Vpreb3* эволюционно консервативный белок и обнаруживается у всех тетрапод [Ott и др., 2022]. Следует отметить, что в нашем эксперименте не обнаруживалась заметная экспрессия прочих элементов лёгкой цепи, что указывает на вероятное отсутствие пре-В клеток в стенке легочного ствола при ЛАГ.

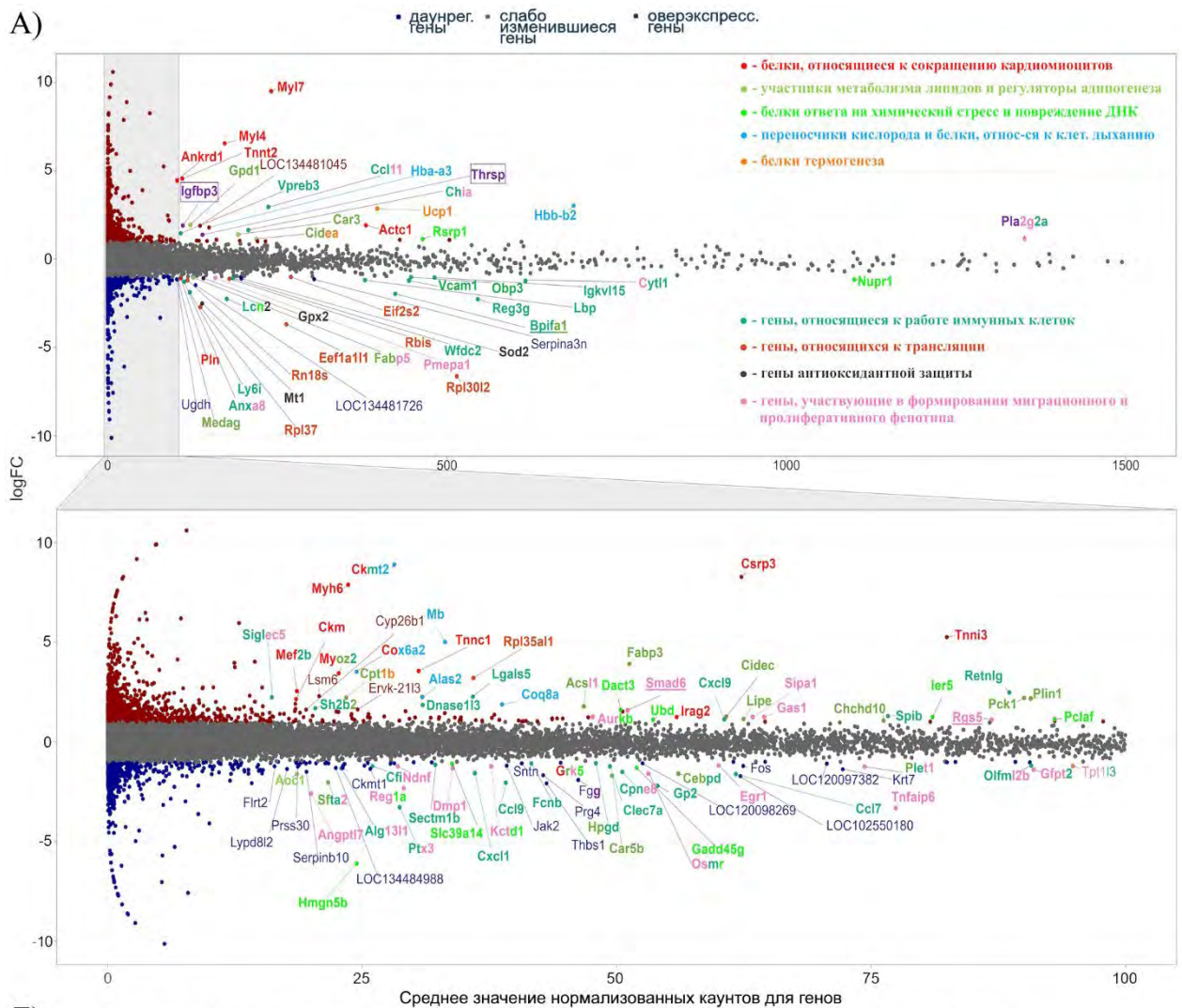
Для генов с базовой экспрессией от 10 до 100 гркм сохраняется схожее распределение по функциональным группам (рис. 4.5 А, нижняя панель). В то же время ряд вышеуказанных функциональных групп среди генов в этом диапазоне не представлен вовсе (гены, связанные с антиоксидантной защитой и тиреоидной сигнализацией). Гены, связанные с трансляционным процессом представлены только *Rpl35all* (ген рибосомного белка субъединицы 60S), экспрессия которого повышена. Среди генов иммунного ответа увеличена экспрессия *Spib* (транскрипционный фактор пре-В и В-лимфоцитов, контролирующий антительный ответ) [Willis и др., 2017]. В категории 10-100 гркм увеличилось количество неиммунных факторов формирования миграционного и пролиферативного фенотипа с изменённой экспрессией. Для *Smad6* и *Rgs5* ранее установлена увеличенная экспрессия при ЛАГ- для *Smad6* в монокроталиновой модели ЛАГ; для *Rgs5* – у пациентов при идиопатической форме ЛАГ [Lu и др., 2023; Ramos и др., 2007]. Продукт гена *Rgs5* является маркёром перицитов в сосудистой стенке, а также белком

приводящим к терминированию сигнализации, опосредованной G-белковыми рецепторами (GPCR). RGS5 ускоряет гидролиз ГТФ, связанный с  $\alpha$ -субъединицей G-белка [Perschbacher и др., 2018]. В частности, повышенная экспрессия Rgs5 подавляет проведение сигнала через ангиотензиновый рецептор, предотвращая гипертрофию миокарда и фиброз, индуцированную активированными рецепторами к АТII [Li и др., 2010].

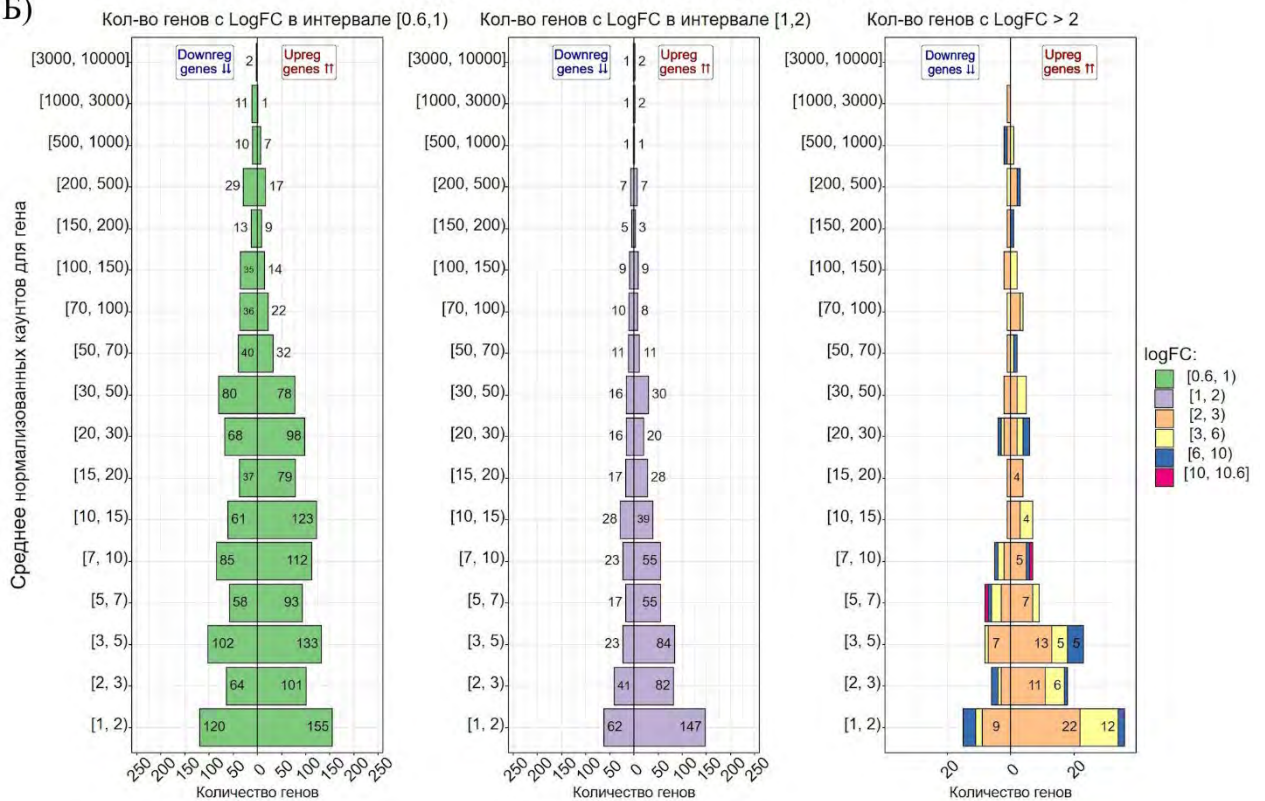
В наших экспериментах увеличена экспрессия *Ankrd1* –гена, который в кардиомиоцитах служит маркером усиленной сигнализации через АТII; экспрессия этого гена также растёт при повышении постнагрузки [Chen и др., 2014]. В противоположность *Ankrd1*, экспрессия *Angptl7* оказалась уменьшена. *Angptl7* является ключевым фактором, АТII-индуцированной пролиферации и миграции ГМК [Jiao и др., 2023; Zhao и др., 2019]. Известно, что т.н. G-рецепторные киназы (GRK) играют основную роль в контроле активности GPCR. В наших экспериментах при моделировании ЛАГ экспрессия одной из GRK - *Grk5*, оказалась снижена. *Grk5* фосфорилирует  $\beta\gamma$ -субъединицы C-концевой фрагмент GPCR и делают возможным его  $\beta$ -аррестин-зависимую интернализацию. GR5 участвует в интернализации эндотелиновых и  $\beta$ -адренергических рецепторов [Schumacher, Koch, 2017], но не вовлечена в интернализацию/десенситизацию  $\alpha$ 1-адрено- и АТ1-рецепторов. Следует отметить, что активация вышеуказанных рецепторов запускает транслокацию *Grk5* в ядро, где данная киназа фосфорилирует *Ndac5* и снимает репрессию с транскрипционного фактора *Mef2* (*Mef2a*, *Mef2c*), опосредующего гипертрофию миокарда и накопление белков тяжелой цепи в ГМК [Gold и др., 2013; Xu и др., 2006]. В нашем эксперименте транскрипционный фактор *Mef2b*, один из главных медиаторов проконстрикторного ремоделирования ГМК, действительно продемонстрировал повышенную экспрессию [Brescia и др., 2018].

Помимо ГМК и кардилмиоцитов, *Mef2b* важен для дифференциации и активации В-лимфоцитов. Экспрессия генов, характерных для В-лимфоцитов (т.н. лимфоцитов герминативных центров лимфоузлов) объясняется присутствием (частично или полностью) в периваскулярном пространстве лёгочных артерий «околососудистых» и бронхопульмонарных лимфоузлов.

A)



B)



**Рис. 4.5 А)** График зависимости относительного изменения экспрессии генов в эксперименте ( $\text{Log}_2\text{FC}$ ) от их усреднённого абсолютного уровня экспрессии. Красным цветом обозначены гены с  $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1$  (рост экспрессии в 2 и более раз по сравнению с контролем), синим цветом – гены с  $\text{Log}_2\text{FC} \leq -1$  (падение экспрессии в 2 и более раз по сравнению с контролем), серым – гены с  $-1 < \text{Log}_2\text{FC} < 1$  (гены с  $\text{Log}_2\text{FC}$ , попадающим внутрь указанного интервала, принято относить к слабо отвечающим). Снизу зависимость приведена для усреднённого абсолютного уровня экспрессии генов в интервале от 0 до 100 гркм. Цветами выделены функциональные группы генов, в которые попадает подавляющее большинство таковых с изменением экспрессии в 2 и более раз. Рамками обведены гены-модификаторы тиреоидной сигнализации. Подчёркнуты гены-маркеры ЛАГ. Б) Популяционные пирамиды, суммирующие приведённые на панели А изменения в относительной экспрессии генов с различным абсолютным уровнем экспрессии в клетке. Диапазоны усреднённых абсолютных уровней экспрессии генов (1-10000 норм. каунтов) и относительных изменений экспрессии (0,6 – 10,6) шире таковых для панели А. Для удобства чтения популяционные пирамиды для генов с  $\text{Log}_2\text{FC}$  в интервалах  $[0,6;1)$  и  $[1;2)$  вынесены в отдельные графики.  $\text{Log}_2\text{FC}=0,6$  соответствует относительному изменению экспрессии в 1,5 раза.

Рисунок 4.5 Б суммирует изменения, которые вызывает ЛАГ, для тех генов, экспрессия которых изменилась хотя бы в 1,5 раза. Структура изменений представляет из себя пирамиду (для всех интервалов  $\text{Log}_2\text{FC}$ ), поскольку с ростом уровня базовой экспрессии в клетке уменьшается количество генов, отреагировавших дифференциальной экспрессией на экспериментальное воздействие. При увеличении значения  $\text{Log}_2\text{FC}$  популяционная пирамида становится менее широкой – так, в интервале  $\text{Log}_2\text{FC}$  от 0,6 до 1 (изменение экспрессии гена от 1,5 до 2 раз, левая панель, зеленый цвет) увеличение базовой экспрессии на порядок от ~10 до ~100 или от ~100 до ~1000 гркм приводит к уменьшению числа дифференциально экспрессируемых генов в 3,56 и 3,82 раза соответственно. Снижение количества дифференциальных генов среди тех, что демонстрировали большую разницу ( $\text{Log}_2\text{FC}$  в интервале от 1 до 2, что соответствует изменению экспрессии от 2 до 4 раз) составляют 4,03 и 7,2 раза (для диапазонов 10-100 и 100-1000 гркм, соответственно, средняя панель, синий цвет). Во всех интервалах  $\text{Log}_2\text{FC}$  популяционная пирамида генов ассиметрична, смещена в сторону преобладания генов с повышенной экспрессией (до уровня средней экспрессии 50 норм. каунтов; ассиметрия растёт с увеличением  $\text{Log}_2\text{FC}$ ).

Популяционная пирамида при значениях средней экспрессии выше 50 гркм выравнивается для интервала  $1 \leq \text{Log}_2\text{FC} < 2$ ; приобретает перекосяк в сторону преобладания генов со сниженной экспрессией для интервала  $0,6 \leq \text{Log}_2\text{FC} < 1$ . Большие относительные изменения экспрессии для слабо экспрессируемых генов неудивительны, так как любые случайные колебания числа прочтений будут сильно влиять на величину относительных изменений таких генов.

В целом, при моделировании ЛАГ наблюдается тенденция к увеличению экспрессии генов.

Асимметричность популяционной пирамиды может говорить о том, что при моделировании ЛАГ для транскрипции становится доступна большая доля хроматина, а также оказывается повышенной интенсивность самой транскрипции. Транскрипция, происходящая на минимальном уровне без участия транскрипционных факторов, является вероятностным процессом, что объясняет значительный рост числа «апрегулированных» (т.е. продемонстрировавших усиление экспрессии) генов, относящихся к категории низкой базовой экспрессии [Raj и др., 2006; Rodriguez, Larson, 2020].

#### ***IV.5.2. Биологические процессы, внутриклеточные процессы и молекулярные компоненты, измененные в наибольшей степени при моделировании ЛАГ***

*Анализ транскрипционного профиля при ЛАГ с использованием априорных групп генов (коллекций) базы данных Gene Ontology (GO)*

Статистически значимо обогащённые коллекции Gene Ontology (GO) и Kegg в существенной степени пересекаются с вышеописанными функциональными группами. База данных GO позволяет анализировать изменения экспрессии генов, относящихся к трем категориям: биологические процессы (BP), внутриклеточные процессы (CC), молекулярные компоненты (MC).

Во всех трёх категориях GO (рис 4.5.1 А) наборы (т.н. «коллекции») генов, экспрессия в которых оказывается повышена, могут быть разбиты на две группы. Первая группа включает наборы генов, связанных с сократительным аппаратом кардиомиоцитов, его отдельными элементами, регуляцией силы и частоты сокращения сердца и условно обозначается как «кардиоколлекции». Вторая группа наборов, включает гены, участвующие в транспорте кислорода и в реализации клеточного дыхания. Вторая группа коллекций обозначена как «транспорт O<sub>2</sub>».

При анализе категорий GO обнаруживается, что при ЛАГ демонстрируют сниженную экспрессию гены коллекций, относящихся к биогенезу рибосом (в основном, малой субъединицы) и инициации трансляции. В категории GO «клеточные компоненты» к вышеуказанным коллекциям добавляются наборы, включающие гены, связанные с внеклеточной средой, а также набор генов, обозначаемый «жгутик сперматозоида». Снижение экспрессии генов данного набора при ЛАГ отражает подавление формирования двигательного аппарата ресничек мерцательного эпителия альвеол.

В категории GO молекулярные компоненты при ЛАГ оказываются подавленными следующие коллекции: – специфическое связывание с ДНК (sequence-specific double-stranded DNA binding) , активность G-белок сопряженных рецепторов («G-protein coupled receptor activity» или «активность GPCR») и активность ферментативных регуляторов («enzyme regulator activity»), а также коллекция «связывание с органическими кислотами», отражающая изменение экспрессии переносчиков жирных кислот.

Значимая апрегуляция коллекции ««активность GPCR»» согласуется с изменениями экспрессии Rgs5 и Grk5, апрегуляция коллекции «enzyme regulator activity» совпадает с ростом экспрессии Rgs5, Smad6 (регулирует активность убиквитин-лигазы Peli1) и Sip1 (активатор ядерных ГТФаз Rap1 и Rap2).

На рис 4.5.1. Б вышеуказанные коллекции упорядочены по уровню значения *p*.

Среди коллекций, демонстрирующих значение *p* близкое к уровню значимости (0,05) обнаруживается «сигнализация, обусловленная протеинкиназой C» («protein kinase C signalling») Вероятно, при моделировании ЛАГ повышается экспрессия генов киназ семейства C.

Для избранных коллекций (выделены цветным шрифтом и подчеркиванием на рис. 5.1) проведен т.н. leading edge анализ (анализ «генного состава», обуславливающего изменение «индекса обогащенности» коллекции). Для апрегулированных коллекций GO BP «sarcomere organization» (организация саркомера) и GO CC «miofibrill» (миофибрилла) гены, которые вносят свой вклад в рост индекса обогащения практически дублируются (рис 4.5.1 А), где они входят в функциональную группу «белки, относящиеся к сокращению кардиомиоцитов». Рост индекса обогащения коллекции GO CC «miofibrill» обусловлен вкладом Ankrd1, чья экспрессия, как указано выше, регулируется сигнальным каскадом рецепторов АТФ и уровнем постнагрузки. Увеличение индекса обогащения коллекции GO MF «sequence-specific double-stranded DNA binding» (в основном содержащей транскрипционные факторы) обусловлен Mef2b и Tbx20. Mef2b экспрессируется как в сократительных, так и в иммунных клетках, но в В-лимфоцитах его роль крайне важна. Tbx20 – один из транскрипционных факторов кардиомиоцитов, который требуется для стабильной экспрессии транскрипционной программы желудочковых кардиомиоцитов [Tang и др., 2022]. Из даунрегулированных коллекций GO BP единственная значимо измененной является «ribosomal small unit biogenesis» (биогенез малой рибосомной субъединицы): на рис. 4.5 А видна пониженная экспрессия Rn18s – 18S-РНК, на основе которой формируется малая рибосомная субъединица. При ЛАГ подавлена не только экспрессия основной РНК малой субъединицы рибосомы, но и всей белковой машинерии, участвующей в её созревании: почти все члены коллекции «биогенез малой рибосомной субъединицы» находятся в зоне с отрицательным

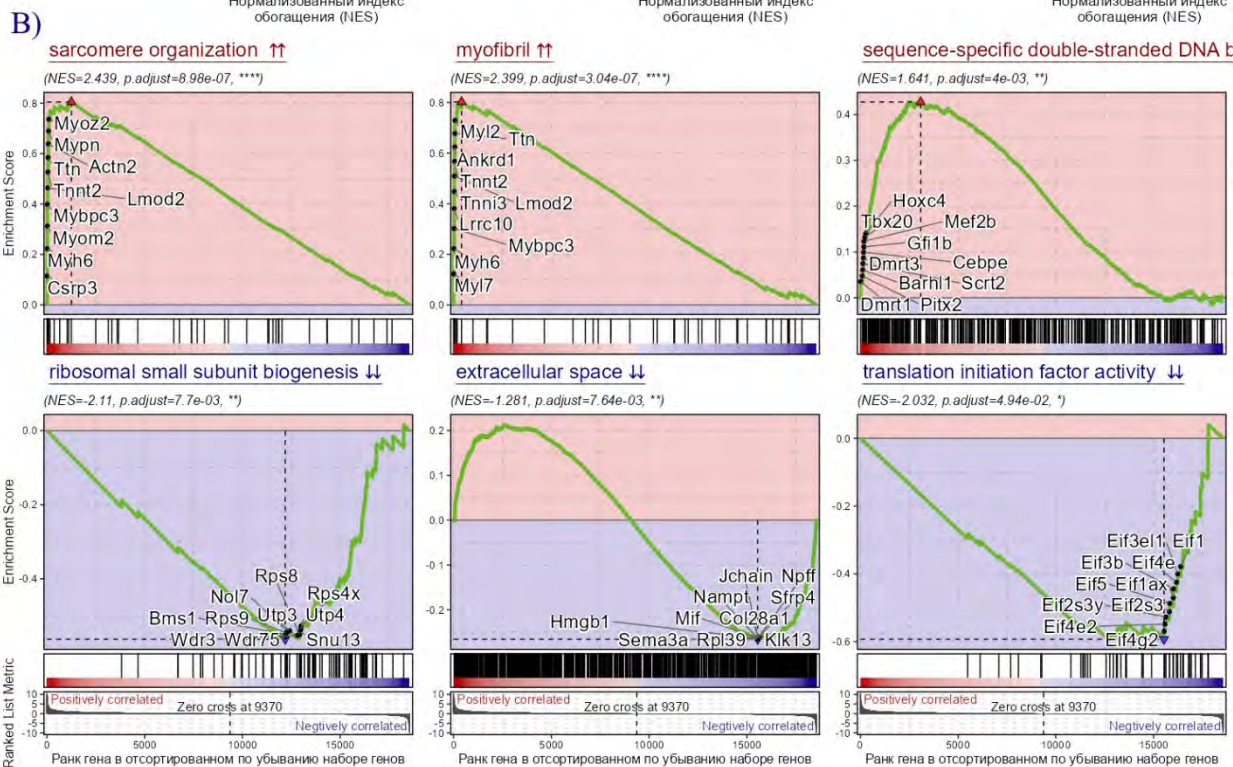
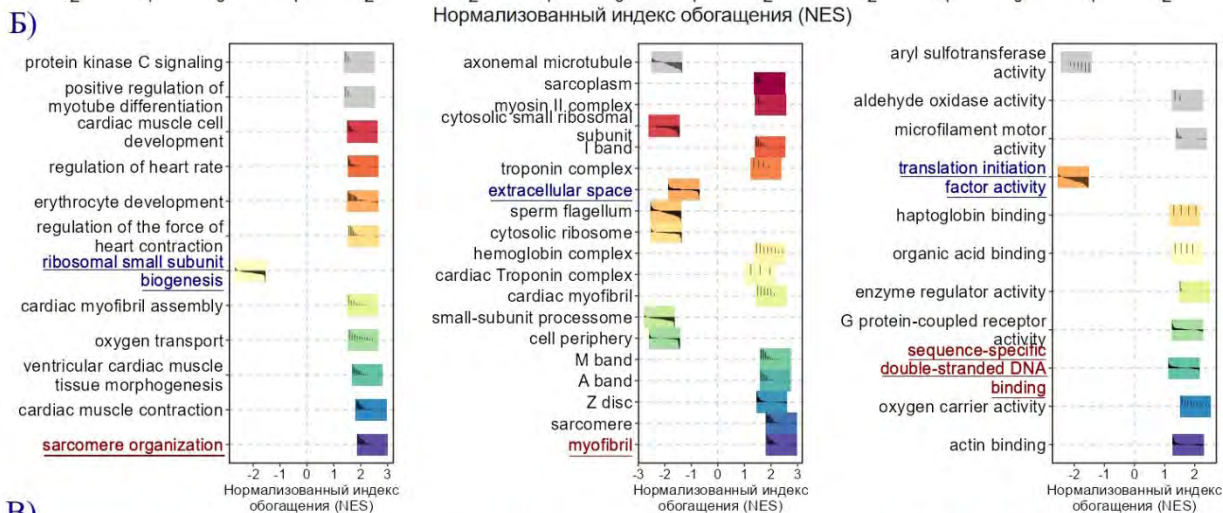
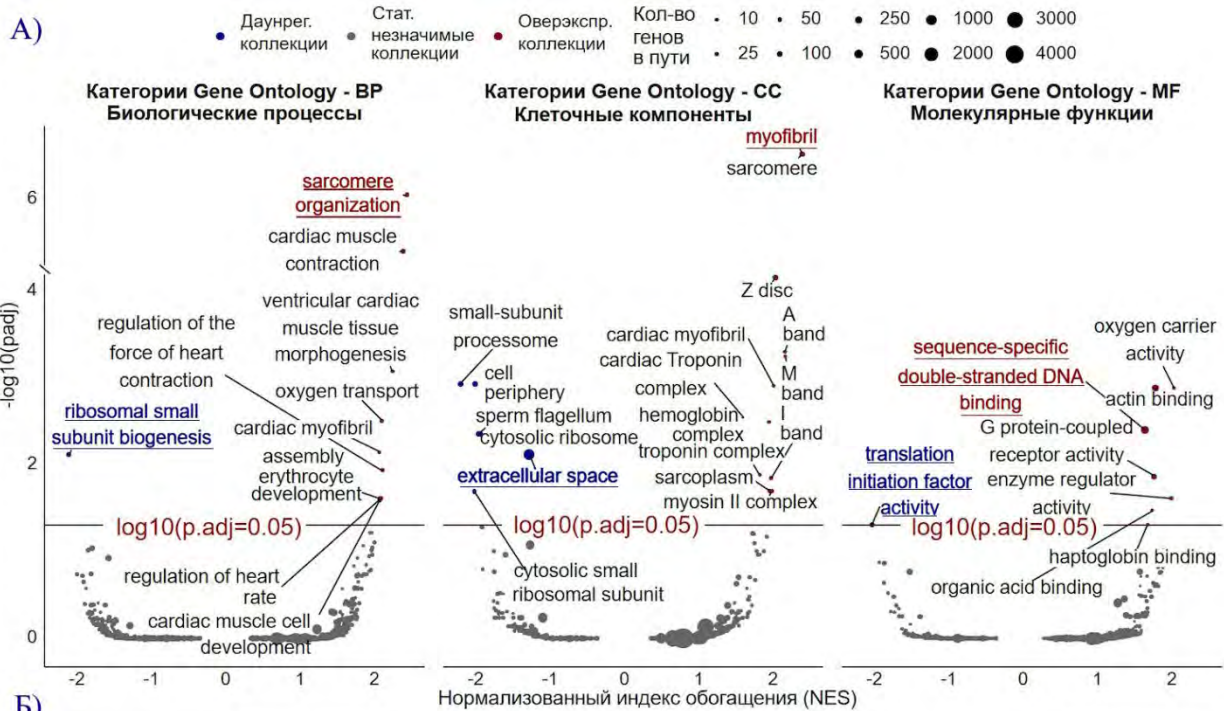
Log<sub>2</sub>FC (вертикальные линии на нижней полосе рис. 4.5.1). Похожая картина наблюдается для коллекции «translational initiation factor activity» (активность факторов инициации трансляции). Рибосомальный стресс, подавление биогенеза рибосом и стабилизация p53 – известное следствие химического повреждения ДНК[Llanos, Serrano, 2010]. Известно, что многие химиотерапевтические препараты подавляют биогенез рибосом [Burger и др., 2010]. В нашем эксперименте наблюдается выраженное подавление биогенеза преимущественно малой рибосомной субъединицы, что отражается в изменении трёх GO коллекций – GO BP «ribosomal small unit biogenesis» и GO CC «small subunit processome» и «cytosolic small ribosome subunit».

Следует отметить, что профиль обогащения крупной коллекции «extracellular space» имеет как минимум (-Log<sub>2</sub>FC), так и максимум (+Log<sub>2</sub>FC), что означает существенное изменение внеклеточного белкового репертуара при ЛАГ. На графике указаны первые 10 генов коллекции, обуславливающие снижение индекса обогащения, то есть гены с отрицательным Log<sub>2</sub>FC и сниженной экспрессией. Указанные гены коллекции по данным литературы связаны с ЛАГ - повышенная экспрессия Rpl39 обнаруживается в макрофагах пациентов с ЛАГ. Важно отметить, что нокдаун Rpl39 при помощи shRNA при ингаляционном введении облегчал симптомы экспериментальной ЛАГ [Wang и др., 2025]. Как и в наших экспериментах, при ЛАГ в эндотелиоцитах и ГМК наблюдается повышенная экспрессия Nampt (НАД-фосфорибозилтрансферазы, катализирующей лимитирующую реакцию в синтезе НАДФ и участвующую в поддержании окислительно-восстановительного потенциала клетки) [Chen и др., 2017]. Другие измененные при экспериментальной ЛАГ гены коллекции связаны с иммунной, в т.ч. аутоиммунной реакцией. Далее рассмотрены гены, экспрессия которых в коллекции «extracellular space» снижена. В частности, снижена экспрессия Mif, который подавляет презентацию антигенов Т-лимфоцитам, а его нокаут усиливает инфильтрацию опухолей CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами и дендритными клетками[Noe, Mitchell, 2020]. Sem3a подавляет пролиферацию и цитотоксичность Т-лимфоцитов[Vadasz, Toubi, 2014]. Снижение экспрессии Sem3a наблюдается в В- и Т-лимфоцитах при ряде аутоиммунных заболеваний[Vadasz, Toubi, 2018]. Hmgb1 – негистонный ДНК-связывающий архитектурный элемент, опосредующий ответ на химическое повреждение ДНК, и одновременно секретируемый белок, выступающий в качестве провоспалительного цитокина и лиганда Tlr4 [Harris, Andersson, Pisetsky, 2012]. В качестве секретируемого иммунными клетками провоспалительного медиатора Hmgb1 участвует в широком круге патологий – инфекционных, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, метаболических и аутоиммунных заболеваниях[Tang и др., 2023]. Установлено, что экспрессия Hmgb1 увеличивается при монокроталиновой модели ЛАГ[Sadamura-Takenaka и др., 2014]. Однако

в нашем эксперименте наблюдается снижение экспрессии Hmgb1. В культуре эндотелиальных клеток и ГМК от пациентов с идиопатической ЛАГ наблюдается повышенная секреция Hmgb1, обусловленная некрозом [Rafikov и др., 2019]. Npff – нейропептид FF, который помимо нейронов [Dai и др., 2015], экспрессируется иммунными клетками и, связываясь с рецептором нейтрофилов MrgprA1, подавляет провоспалительную сигнализацию, опосредованную IFN $\gamma$ . Пептид Npff индуцирует поляризацию макрофагов и нейтрофилов в т.н. «противовоспалительный» VM2-и N2-фенотип [Waqas и др., ] [Gour и др., 2024]. Таким образом, анализ функции продуктов 10 измененных генов коллекции свидетельствует в пользу протекания активного иммунного процесса с участием В- и Т-лимфоцитов при экспериментальной ЛАГ, что согласуется со литературными данными, а также представленными в разделе IV.5.1. данными.

Следует отметить, что анализ базы данных GO не позволил обнаружить обогащённые коллекции, имеющие отношение к иммунитету. Таковые коллекции обнаруживаются при анализе классической базы данных Kegg (рис 4.5.2). Значимое обогащение коллекции «primary immunodeficiency» (первичный иммунодефицит) согласуется со снижением экспрессии большего числа генов из соответствующей функциональной группы (рис. 4.5 А). Обогащение коллекции базы данных Kegg «antigen processing and presentation», подтверждает участие В-лимфоцитов в патологическом процессе при ЛАГ. При анализе Kegg также обнаруживаются две значимо обогащенные коллекции, относящиеся к аутоиммунным патологиям: «Type I diabetes mellitus» (диабет первого типа), «Autoimmune thyroid disease» (аутоиммунный тиреоидит). Помимо этого, согласно Kegg обогащено две коллекции, относящиеся к патологическим процессам, в которых активирован Т-клеточный иммунитет – «allograft rejection» (отторжение аллотрансплантата) и «graft-versus-host disease» (реакция трансплантат против хозяина, индекс обогащения данной коллекции является значимым без учета статистических (fdr) поправок, рис 4.5.2.Б).

Согласно Kegg оказываются значимо обогащены коллекции, относящиеся к ответу на вирусные инфекции - «virion-Herpesvirus» (вирион герпеса) и «viral myocarditis» (вирусный миокардит). Первая свидетельствует о снижении экспрессии РНК вируса герпеса и реакции на вирусную РНК, вторая - свидетельствует об активации специфического ответа на вирусную инвазию миокарда. Обогащение двух вышеуказанных коллекций, вероятно, является результатом изменения иммунного ответа на наблюдаемую в наших экспериментах возросшую экспрессию ретровирусного гена и протеина Ervk-2113.



**Рис.4.5.1** А) Volcano-графики для коллекций трёх категорий Gene Ontology (GO) – биологические процессы (BP), клеточные компоненты (CC) и молекулярные функции (MF). Ось Y – отрицательный логарифм скорректированного ( $\text{fdr}; \alpha < 0,05$ ) p-значения коллекции, ось X – нормализованный индекс обогащения коллекции (NES – normalized enrichment score). Уровень скорректированного p-значения=0,05 отмечен горизонтальной красной прямой. Статистически значимые коллекции отмечены красным цветом, если они апрегулированы, или синим цветом, если они даунрегулированы. Количество генов в коллекции отображается размером точки. Б) Summary-графики для статистически значимо обогащённых коллекций во всех категориях GO. Коллекции отсортированы по скорректированному p-значению от большего к меньшему (у стат.незначимых коллекций - серый фон). Вертикальными отрезками внутри цветных прямоугольников приведены значения  $\text{Log}_2\text{FC}$  для генов из коллекции в отранжированном по  $\text{Log}_2\text{FC}$  списке генов, взятых в анализ. По оси X отложено то же самое, что и в А. Цветом и подчёркиванием на А и Б выделены названия коллекций, выбранных для визуализации профиля обогащения. В) Профили обогащения выбранных апрегулированных коллекций (верхние профили, названия путей в заголовках профилей выделены красным и оканчиваются символом  $\uparrow\uparrow$ ) и даунрегулированных коллекций (нижние профили, названия путей в заголовках профилей выделены синим и оканчиваются символом  $\downarrow\downarrow$ ) для каждой категории GO. В подзаголовках приведены значения нормализованного индекса обогащения (NES) и скорректированного p-значения. По оси Y отложен индекс обогащения коллекции, положительная область закрашена розовым, отрицательная – фиолетовым. Ось X состоит из двух элементов. Первый элемент уникален для каждого профиля и приведён под каждым профилем в виде прямоугольной полосы, той же ширины, что и профиль. и представляет собой репрезентацию генов коллекции в упорядоченном по  $\text{Log}_2\text{FC}$  списке анализируемых генов: гены коллекции представлены вертикальными отрезками, а упорядоченный список генов - цветной полосой, в которой положительные значения  $\text{Log}_2\text{FC}$  для генов закодированы красным цветом, а отрицательные – фиолетовым. Второй элемент является общим для всех профилей и представлен только для нижних профилей (во избежание дублирования) в виде прямоугольной полосы тех же размеров, что и первый элемент. Это мини-репрезентация  $\text{Log}_2\text{FC}$  для всех генов, входящих в упорядоченный по  $\text{Log}_2\text{FC}$  анализируемый список генов, у которой по оси Y приведён диапазон  $\text{Log}_2\text{FC}$ , по оси X приведены порядковые номера генов, вертикальной пунктирной линией отмечено в какой момент  $\text{Log}_2\text{FC}$  меняет знак и приведён соответствующий порядковый номер гена в списке. Интервал, в котором находятся гены с положительным  $\text{Log}_2\text{FC}$  обозначены красной надписью «Positively correlated» и находятся слева от пунктирной линии, Интервал, в котором находятся гены с отрицательным  $\text{Log}_2\text{FC}$  обозначены фиолетовой надписью «Negatively correlated» и находятся справа от пунктирной линии. В всех профилях подписаны первые 10 генов отклоняющие индекс обогащения коллекции в положительную область.

*Анализ транскрипционного профиля при ЛАГ с использованием априорных групп генов (коллекций) базы данных Kegg (Kyoto genes and genomes)*

Увеличенная экспрессия сократительных белков миокарда при экспериментальной ЛАГ выражается в значимом обогащении коллекций «cardiac muscle contraction» (сокращение сердечной мышцы), «cytoskeleton in muscle cells» (цитоскелет в мышечных клетках), и, отчасти, «motor proteins» (моторные белки) и «adrenergic signalling in cardiomyocytes» (адренергический сигналинг в кардиомиоцитах). В случае последней коллекции, первые 10 дифференциальных генов (т.е. гены, имеющие значительный + Log<sub>2</sub>FC), существенно влияющие на индекс обогащения, включают гены актина, лёгких цепей миозина и тропонинов (рис. 4.5.3 В). Помимо сократительных белков в первую десятку генов с повышенной экспрессией этой коллекции входит Scn5a - α5-субъединица натриевого канала (Nav1.5, сердечная изоформа) и Atp1b4 – β4-субъединица Na/K-АТФазы. В силу тех же причин (т.е. за счет включения значительной части генов сократительных белков кардиомиоцитов) обогащены коллекции, характеризующие изменения при кардиомиопатиях различного типа – «hypertrophic cardiomyopathy» (гипертрофическая кардиомиопатия) и «dilated cardiomyopathy» (дилатационная кардиомиопатия).

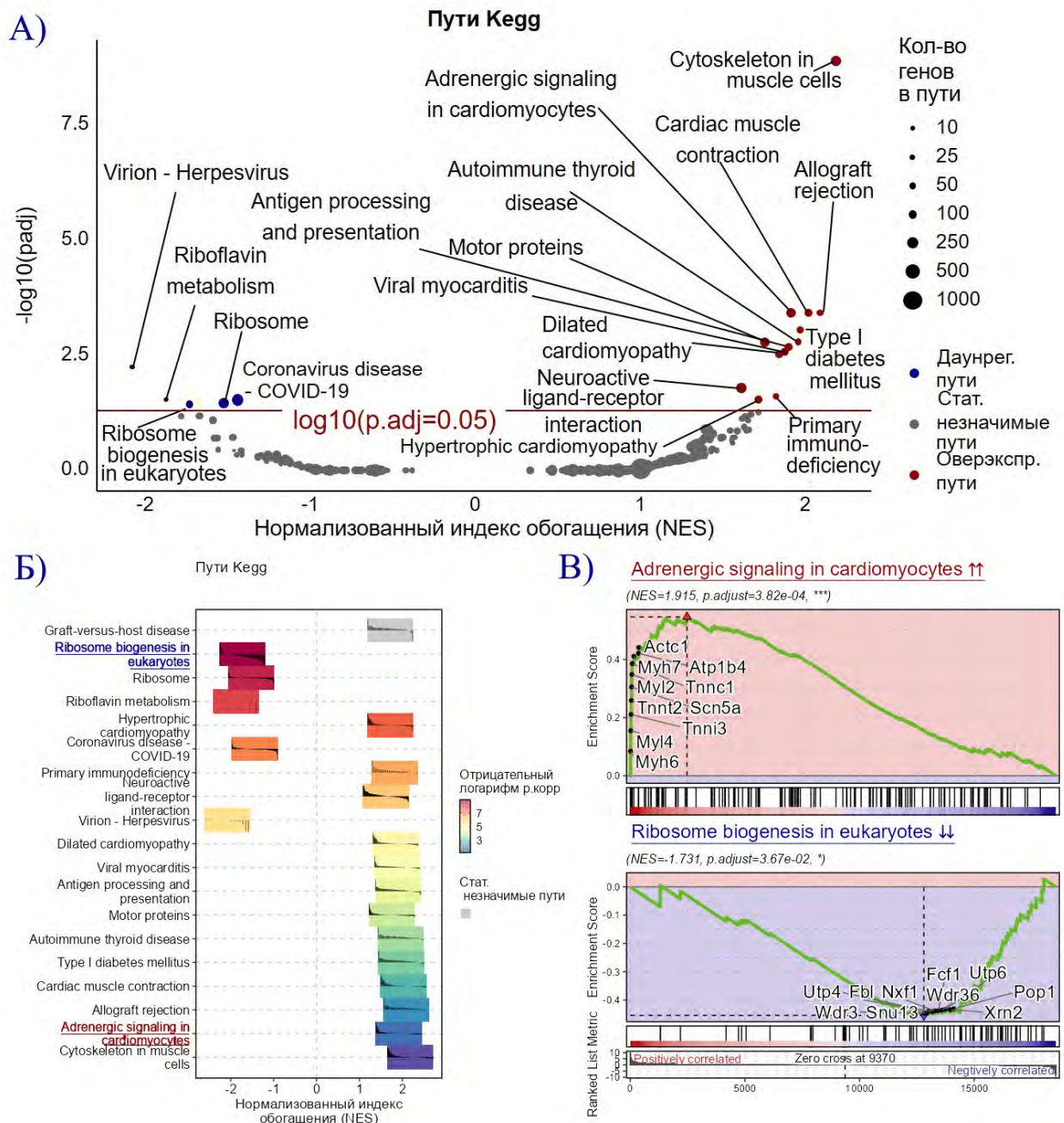
Среди значимо измененных коллекций с повышенной экспрессией генов присутствует также «neuroactive ligand-receptor interaction» (нейроактивное взаимодействие рецептора с лигандом). Эта коллекция включает перечень генов GPCR и ядерных рецепторов. Обогащение вышеуказанной коллекции согласуется с представлениями о формировании т.н. «нейрогуморального дисбаланса» при ЛАГ [Maron, Leopold, Hemnes, 2020].

Среди значимо измененных коллекций с пониженной экспрессией генов, помимо «рибосомных», обнаруживаются «riboflavin metabolism» (метаболизм рибофлавина), «coronavirus disease – COVID-19». Коллекция «riboflavin metabolism» содержит 12 генов, из которых экспрессия сильно уменьшилась при ЛАГ для генов Enpp3 и Rfk-ps3. Rfk-ps3 – малоэкспрессируемый псевдоген рибофлавинкиназы, а Enpp3 – эктонуклеотидная мембранная пирофосфатаза/фосфодиэстераза, которая является одним из 3-х диэстераз расщепляющих цГМФ/цАМФ [Mardjuki и др., 2024]. Помимо диэстеразной активности, Enpp3 также является маркером тучных клеток и базофилов [Kabashima и др., 2018]. Таким образом, снижение экспрессии Enpp3 может говорить об уменьшении присутствия данных клеток в сосудистой стенке при ЛАГ. Коллекция «coronavirus disease – COVID-19» среднего размера, включает гены элементов каскадов ангиотензиновой сигнализации – гены AT1 и Mas-рецепторов и ангиотензин-превращающего фермента ACE, а также молекулярных компонентов, входящих в пути иммунного ответа, относящихся к врождённому клеточному

и неклочному иммунитету, некоторые элементы системы гемостаза (фибриноген и тромбин). Следует указать, что в наших экспериментах экспрессия тромбина фиксируется в следовых количествах ( $>1 < 10$  rpkm). Также при моделировании ЛАГ в тканевых образцах оказывается снижена более чем в 2 раза экспрессия тромбоспондина (Thbs1) – белка внеклеточного матрикса и основного компонента  $\alpha$ -гранул тромбоцитов; белка, содержащегося в тельцах Вейбеля-Паллада клеток эндотелия [Konwar и др., ]. Кроме того, оказывается снижена экспрессия фибриногена  $\gamma$  (Fgg) (рис 4.5 А, выноска). На экспрессию фибриногена  $\gamma$  (в печени) оказывают существенное влияние тиреоидные гормоны, но данные литературы противоречивы [Masood и др., 2020; Salloum-Asfar и др., 2015]. Также показано, что гипертиреоз приводит к росту экспрессии Thbs1 [Zhang и др., 2024]. Повышение экспрессии Thbs1, в свою очередь, способствует, согласно некоторым литературным данным, эндотелиально-мезенхимальному переходу у мышей на модели ЛАГ, вызванной гипоксией [Peng и др., 2024]. Также предположительно Thbs1 играет значительную роль в иммуносупрессии, при развитии злокачественных опухолей щитовидной железы, оказывая влияние на Т-хелперы и Treg [Jin и др., 2022]. Снижение экспрессии подавляющего большинства генов иммунного ответа, входящих в коллекцию «coronavirus disease – COVID-19», приводит к статистически значимому отрицательному индексу обогащения коллекции.

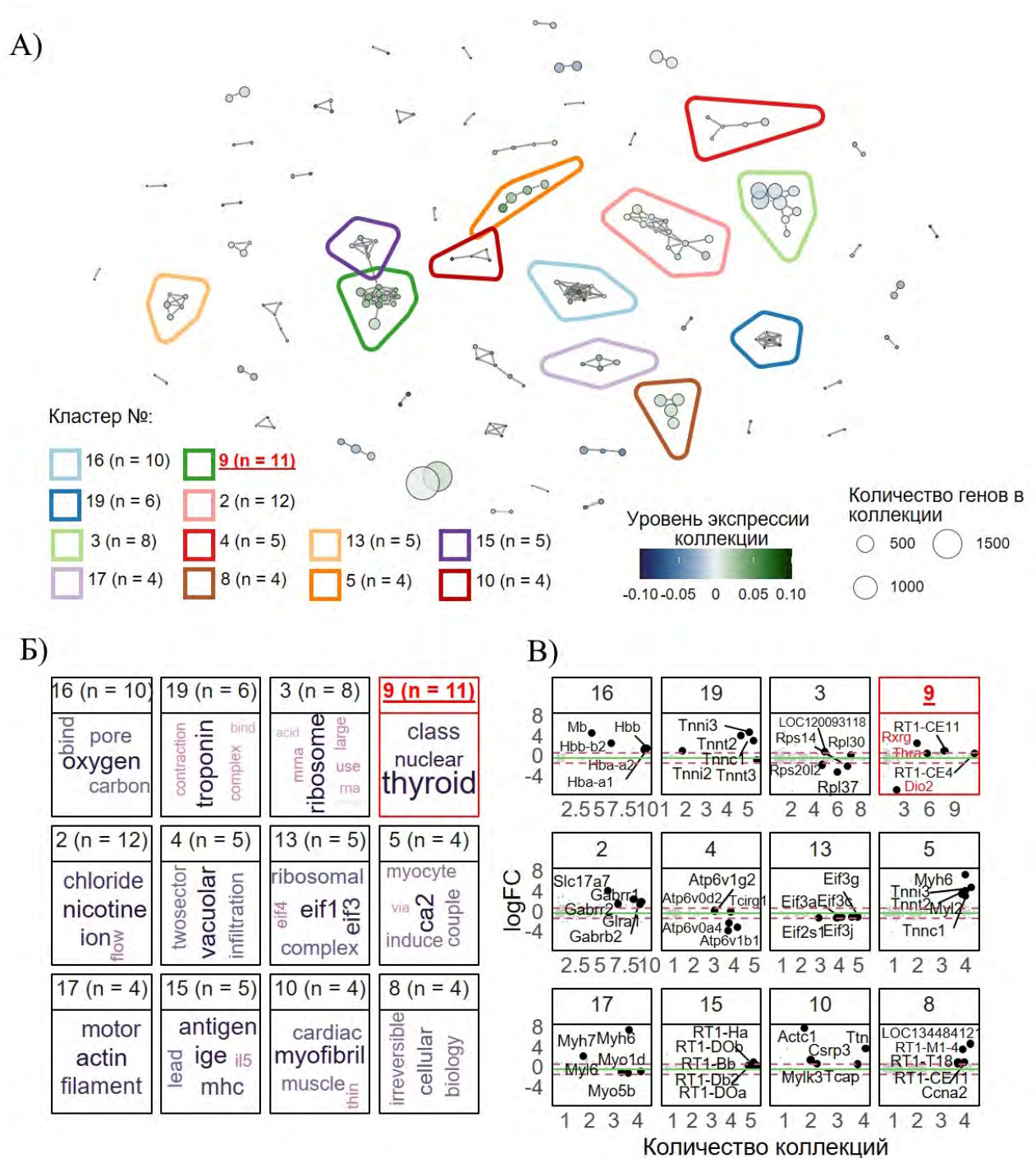
*Анализ транскрипционного фенотипа экспериментальной ЛАГ на основе кластеризации априорных групп генов*

Для выявления связи между фенотипом экспериментальной ЛАГ и ключевыми генами с максимальной дифференциальной экспрессией (дифференциальными генами) использовали кластеризацию всех обнаруженных значимо обогащённых коллекций GO и Kegg (рис 4.5.4 А). «Облака слов» (рис 4.5.4. Б), а также графики зависимости степени изменения экспрессии ( $\text{Log}_2\text{FC}$ ) гена от количества коллекций, в которые этот ген включён, приведены для первых 12 наиболее значимых кластеров (рис 4.5.4). Наиболее значимые кластеры (показаны внутри цветных многоугольниках на Рис. 4.5.4 А), в значительной мере пересекаются с функциональными группами, описанными в разделе IV.5.1., по генному составу. Кластеры №№ 19, 5, 10, 17 включают коллекции и гены, относящиеся к сокращению кардиомиоцитов №№ 3 и 13 включают коллекции и гены, относящиеся к трансляции. Кластер №16 включает коллекции и гены ферментов клеточного дыхания и переносчиков  $\text{O}_2$ . Кластер №9 (рис 4.5.4. В), определяемый терминами «thyroid» (тиреоидный), «nuclear» (ядерный) (рис 4.5.4 Б) объединяет ряд коллекций и генов, непосредственно относящиеся к тиреоидной сигнализации.



**Рис. 4.5.3** А) Volcano-графики для коллекций Kegg. Б) Summary-графики для статистически значимо обогащённых коллекций Kegg. В) Профили обогащения выбранных ап- и даунрегулируемых коллекций Kegg. Обозначения те же, что и для Gene Ontology.

Среди генов кластера с наиболее выраженной дифференциальной экспрессией и фигурировали ретиноидный X-рецептор G (*Rxrg*) и тиреоидный рецептор A (*Thra*), а также ген деиодиназы 2 (*Dio2*), (рис 4.5.4. В). Деиодиназа 2 – главный внутриклеточный фермент, переводящий тироксин (Т4) в трийодтиронин (Т3)[Russo, Salas-Lucia, Bianco, 2021]. Рост концентрации Т3 в плазме снижает экспрессию деиодиназы 2[Bianco, Kim, 2006].



**Рис. 4.5.4** А) Репрезентация всех значимо обогащённых коллекций. Коллекции представлены в виде кругов, размер которых отражает количество генов в коллекции. Между любыми двумя коллекциями, имеющими свыше 25% общих генов, проводится ребро. Объединение путей в кластеры произведено на основе меры Жаккарда, рассчитанной для каждой пары коллекций. Уровень экспрессии коллекции представляет из себя разницу между образцами в индексе коэкспрессии генов в коллекции, разработанному для применения в индивидуальных образцах. Б) «Облако слов» для каждого кластера, построенное для слов с наибольшей частотой из полнотекстовых описаний для каждой, входящей в кластер коллекции (число коллекций, входящих в кластер представлено в скобках в заголовке каждого «облака»). В) Log<sub>2</sub>FC для наиболее аннотированных генов кластера. По оси X отложено количество коллекций кластера, в которых присутствует ген. По оси Y отложено Log<sub>2</sub>FC гена, зелёной прямой обозначен Log<sub>2</sub>FC=0, красным пунктиром Log<sub>2</sub>FC равный 1 и -

1, т.е. границы, отмечающие изменение экспрессии гена в 2 и более раз. Ярко-красным выделен «тиреоидный» кластер и гены, прямо относящиеся к тиреоидному сигналингу.

### IV.5.3. Экспрессия генов тиреоидной оси при ЛАГ

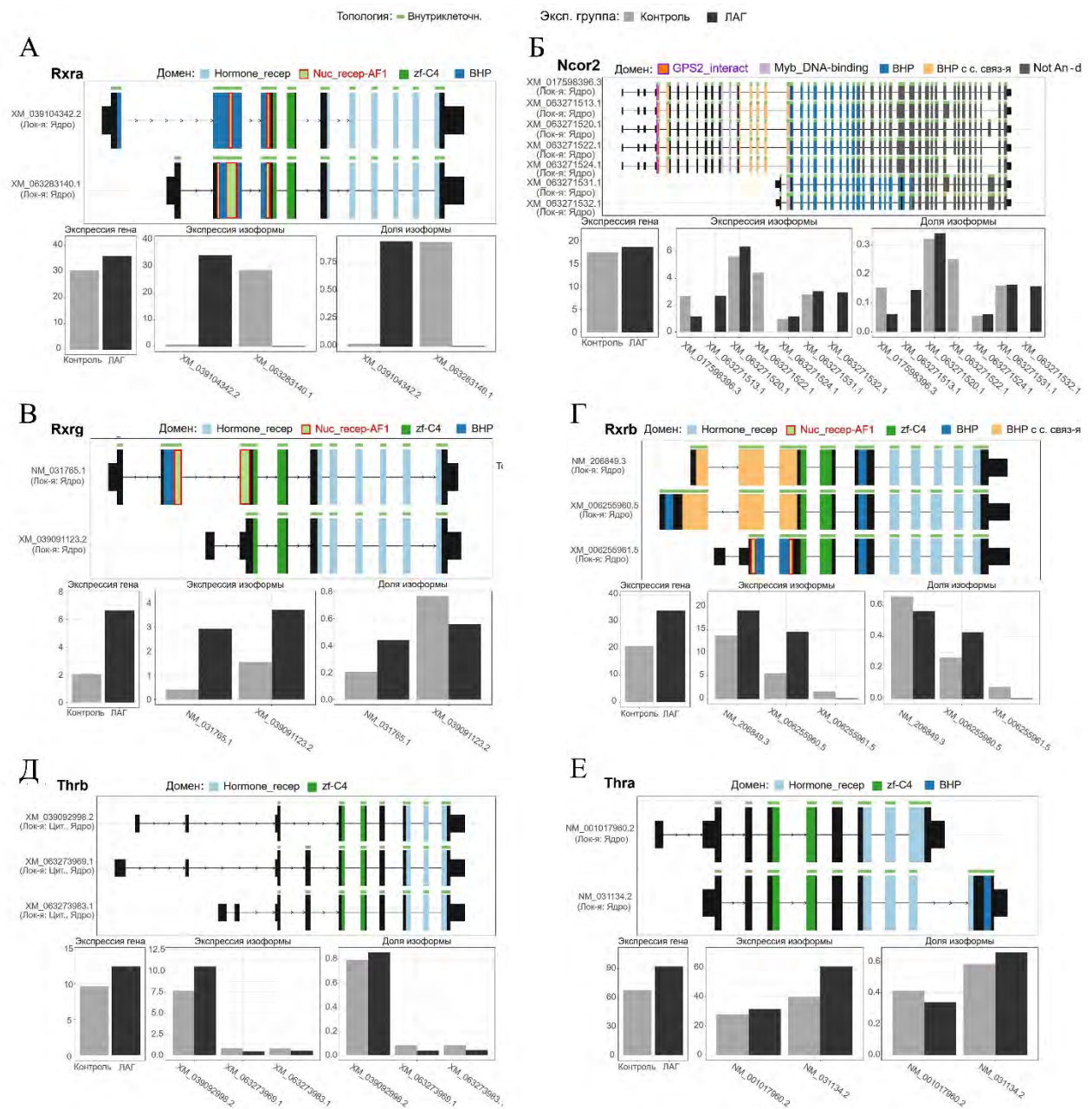
Важно, что лёгочная гипертензия приводит к выраженному изменению экспрессии некоторых ключевых генов, участвующих в тиреоидной сигнализации: печеночного белка, индуцируемого тиреоидными гормонами – *Thrsp*, а также белка *Igfbp3*, связывающего инсулинподобный фактор роста (*Igf*) (Рис 4.5 А). Белок, связывающий *Igf* известен также как корепрессор тиреоидных ядерных рецепторов *ThrA/ThrB* [Varma Shrivastav и др., 2020].

*Транскриптомные признаки изменения тиреоидной оси и дискоординации тиреоидного контроля при экспериментальной ЛАГ*

Известно, что начальный этап тиреоидной сигнализации включает этап гомо или гетеродимеризации тиреоидных рецепторов. Партнерами для гетеродимеризации тиреоидных рецепторов чаще всего выступают ретиноидные X-рецепторы (*RXR*) [Boron, Boulpaep, 2017]. За димеризацией следует связывание с коактиваторами, либо корепрессорами, самым распространённым из которых является белок *Ncor2*, также известный как *Smrt* (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors - сайленс-медиатор рецепторов ретиноевой кислоты и тироидных гормонов).

Экспрессия при ЛАГ растёт как для тиреоидных рецепторов (рис 4.5.5 Д, Е, в наибольшей степени для *Thra*), так и для *RXR* (рис 4.5.5 А, В, Г) всех типов (в наименьшей степени для *Rxra*). Контроль экспрессии генов-мишеней тиреоидных гормонов помимо димеризации *Thr* с *RXR* требует образования комплекса между димером и коактиватором/корепрессором [Brent, 2012]. *RXR* несут 2 сайта связывания корегуляторов: N-концевой сайт AF-1 (рис 4.5.5, А, В, Г *Nuc\_recep-AF1*), а также C-концевой AF-2 сайт в лиганд-связывающем домене [Weikum, Liu, Ortlund, 2018]. Преимущественная корегуляция происходит за счет AF-2 сайта *RXR*, однако ряд коактиваторов/корепрессоров, например семейство ядерных корепрессоров *Ncoг*, использует оба сайта в одинаковой степени [Lavery, Msewan, 2005]. На рис. 4.5.5 на верхних панелях всех частей рисунка приведены результаты анализа аминокислотных последовательностей изоформ тиреоидных и *RXR*, а также ядерного корепрессора *Ncor2* для контрольных образцов, а также для образцов, полученных от животных с ЛАГ. При ЛАГ для *Rxra* (рис 4.5.5 А) обнаруживается т.н. изоформное переключение – изменение типа преобладающего транскрипта и, соответственно, типа белка, в результате которого экспрессируемая изоформа имеет укороченный вдвое AF-1 сайт. Для *Rxrb* (рис. 4.5.5 Г) выявляется полное подавление экспрессии изоформы, содержащей AF-1

сайт. Таким образом, два RXR с наибольшей экспрессией при ЛАГ теряют функциональность, за счет накопления AF-1-некомпетентных изоформ. Увеличение экспрессии AF-1-компетентных изоформ наблюдается только для RXR-рецептора типа  $\gamma$  (R $\gamma$ rg, рис. 4.5.5 В). При ЛАГ R $\gamma$ rg демонстрирует самую низкую экспрессию. Изоформный состав белков экспрессируемых Ncor2 при ЛАГ также изменяется – уменьшается общее количество изоформ с сайтом связывания GPS2-элемента Ncor2-HDAC3 комплекса (рис 4.5.5 Б).



**Рис. 4.5.5** Комбинированные рисунки объединяют данные экспрессии и результаты анализа последовательностей изоформ - выровненные друг относительно друга в соответствии с геномными координатами последовательности транскриптов, на которых прямоугольниками обозначены экзоны, а линиями и стрелками интроны. На последовательностях транскриптов цветом помечены обнаруженные участки белковых последовательностей - домены и внутренне-неупорядоченные регионы - ВНР (закрашенные участки экзонов), а также топология (размечены узкой цветной полосой над экзонами). Слева для каждого транскрипта приведён его идентификатор, характеристика изменения его доли в общей экспрессии, а также локализация в клетке. А, В, Г – ретиноидные X-рецепторы (RXR $\alpha$ , RXR $\gamma$ , RXR $\beta$ ). Цветом выделен pfam-домен Nuc\_recep-AF1 – сайт связывания с корегулятором AF1. Б – корепрессор Ncor2 (SMRT - silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors). Основной корепрессор тиреоидных и ретиноидных рецепторов. Цветом выделен pfam-домен GPS2\_interact – сайт взаимодействия с GPS2 – субъединицей Ncor2-Hdac3 комплекса. Д, Е – рецепторы к тиреоидным гормонам (ThrB, ThrA)

Следует отметить, что в наших экспериментах наблюдаются признаки как гипер-, так и гипотиреоза. В частности, в тканевых образцах животных с ЛАГ обнаруживается увеличенная экспрессия генов тяжёлых цепей миозина [Klein, Danzi, 2007], гена белка, индуцируемого тиреоидными гормонами - *Thrsp*, генов белков термогенеза – *Ucp1* и *Cpt1b*, генов Na/K-АТФазы, переносчиков кислорода и ферментов, относящихся к клеточному дыханию [Boron, Boulpaer, 2017]. В тоже время, при ЛАГ наблюдается уменьшение экспрессии фосфоламбана, что является признаком гипертиреоза [Klein, Danzi, 2007]. С другой стороны наблюдается повышенная экспрессия секретируемой фосфатазы *Pla2g2a* и *ThrA*, находящихся под негативным тиреоидным контролем [Klein, Danzi, 2007; Sharma и др., 2014], а также падение экспрессии генов белков, относящихся к трансляции и к метаболизму липидов, генов отвечающих за липолиз (*Fabp5*) при одновременном росте экспрессии белков, отвечающих за слияние жировых капель (*Cidea*) и стимулирующих адипогенез, что может служить признаками гипотиреоза.

#### ***IV.5.4. Особенности и степень изменения транскрипционного профиля при ЛАГ, обусловленная переключением экспрессируемых изоформ и альтернативным сплайсингом***

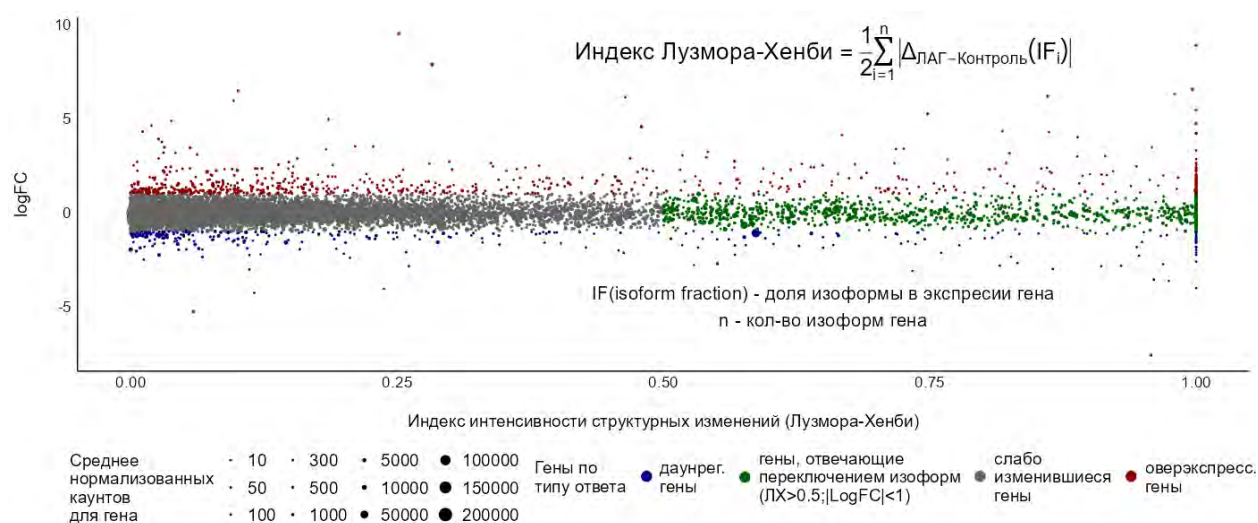
##### *Функциональная принадлежность генов, демонстрирующих изоформное переключение при ЛАГ*

Гены, продукты которых имеют несколько изоформ, часто реагируют, при развитии патологии либо в эксперименте, изменением изоформного состава, но не изменением абсолютного уровня экспрессии – т.е. демонстрируют т.н. «изоформное переключение» [Dam, Olsen, Vitting-Seerup, 2023; Glinos и др., 2022]. В данной работе, в связи с отсутствием возможности статистически выявить гены со значимым изоформным переключением, для каждого гена, транскрипция которого приводит к появлению более одной изоформы, определялся индекс интенсивности структурных изменений экспрессии его изоформ или индекс Лузмора-Хэнби (ИЛХ, рис. 4.5.6). Индекс ИЛХ рассчитывается для гена, как сумму абсолютных изменений доли экспрессии каждой его изоформы между ЛАГ и контролем, поделенную на 2. Данный индекс меняется в диапазоне от 0 до 1, где 1 – это полное замещение одной из изоформ. Далее мы разделили популяцию генов на следующие категории:

Преимущественный тип реакции	Log <sub>2</sub> FC	индекс Лузмора-Хэнби(ИЛХ)
Гены, реагирующие изменением экспрессии	Log <sub>2</sub> FC >1	ИЛХ≤0,5

Гены, реагирующие изменением изоформного состава	$ \text{Log}_2\text{FC}  \leq 1$	$\text{ИЛХ} > 0,5$
Гены, реагирующие изменением экспрессии и изоформного состава	$ \text{Log}_2\text{FC}  > 1$	$\text{ИЛХ} > 0,5$
Слабо реагирующие гены	$ \text{Log}_2\text{FC}  \leq 1$	$\text{ИЛХ} \leq 0,5$

Значительная часть генов при ЛАГ реагировала преимущественным изменением изоформного состава (рис 4.5.6), при этом в силу незначительных изменений в экспрессии данных генов для определения их функциональной принадлежности можно использовать только т.н. тесты «перепредставленности» генов в коллекциях. Данные тесты проводились для коллекций GO с помощью сервиса ShinyGO 0.84[Ge, Jung, Yao, 2020].

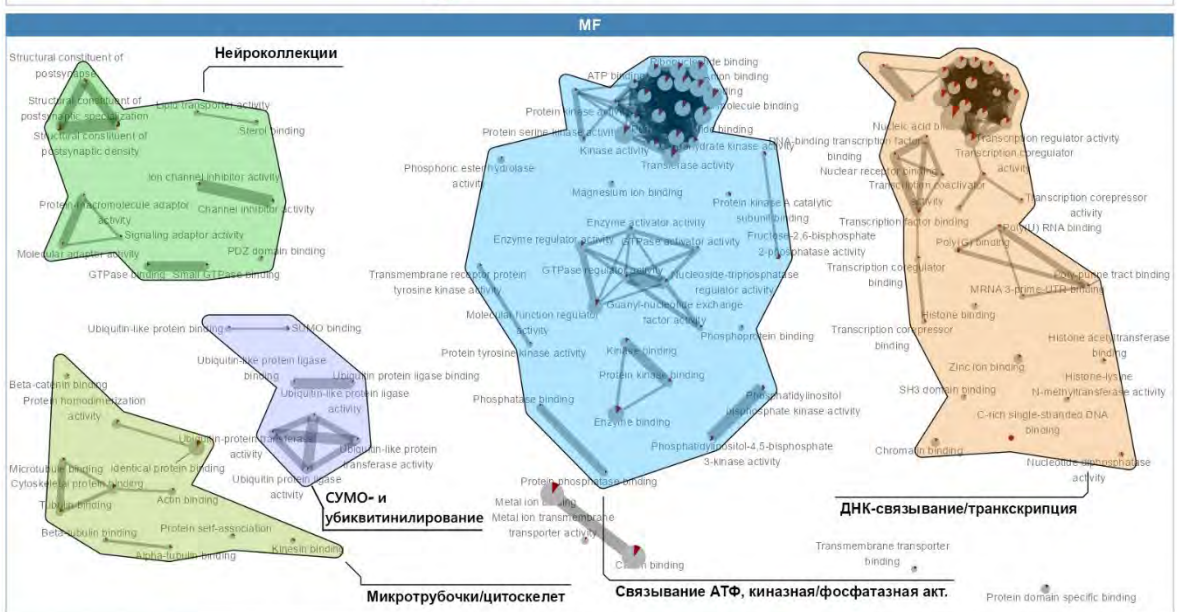
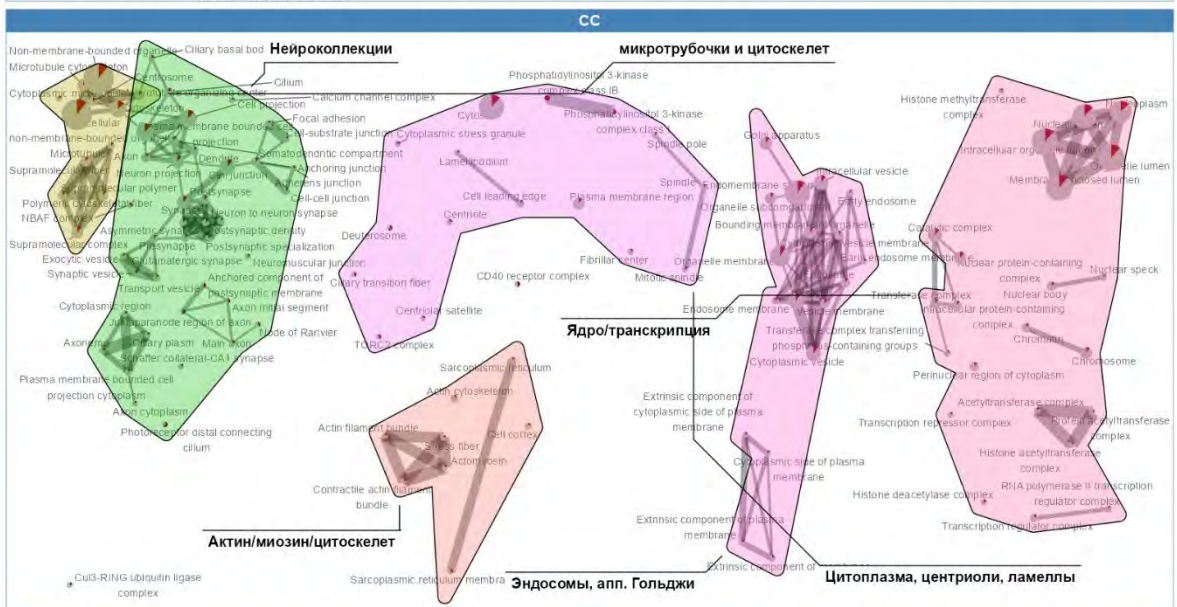
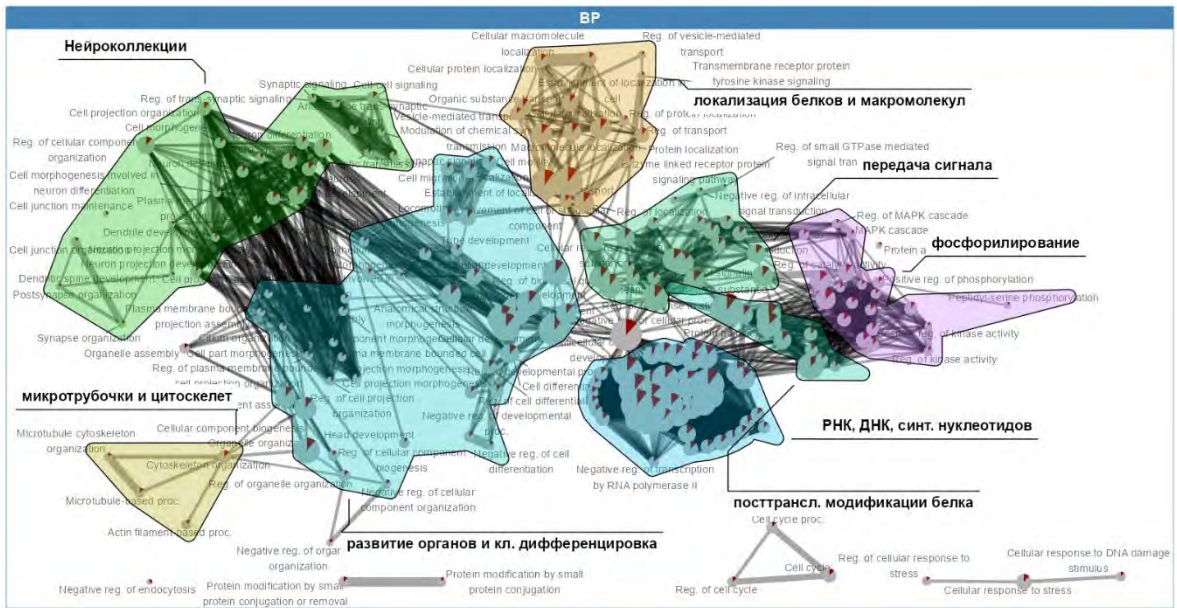


**Рис 4.5.6** График зависимости относительного изменения экспрессии генов в эксперименте ( $\text{Log}_2\text{FC}$ ) от индекса интенсивности структурных изменений (Лузмора-Хэнби). Красным цветом обозначены гены с  $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1$  (рост экспрессии в 2 и более раз по сравнению с контролем), синим цветом – гены с  $\text{Log}_2\text{FC} \leq -1$  (падение экспрессии в 2 и более раз по сравнению с контролем), серым – гены с  $-1 < \text{Log}_2\text{FC} < 1$  (гены с  $\text{Log}_2\text{FC}$ , попадающим внутрь указанного интервала, принято относить к слабо отвечающим), зелёным обозначены гены, попавшие внутрь интервала  $-1 < \text{Log}_2\text{FC} < 1$ , но с индексом Л-Х>0.5, т.е гены, отреагировавшие преимущественно изменением изоформного состава, а не экспрессией. Размером обозначен усреднённый между образцами абсолютный уровень экспрессии (нормализованные каунты).

Значимо обогащённые коллекции, гены которых демонстрируют изоформное переключение, сгруппированы вручную, основываясь на аспектах/особенностях более общих клеточных процессов/структур (рис. 4.5.7), которые они представляют. Следует отметить, что во всех категориях GO обнаруживаются коллекции, связанные с нейронами, аксонами, синапсами и пр., которые были объединены в группу «Нейроколлекции». В категории GO BP группа «Нейроколлекции» значительно пересекается по включенным генам с другими коллекциями группы, такими как «развитие органов и кл.

дифференцировка». Пересечения коллекций отражены с помощью ребер, которые соединяют коллекции, имеющие от 10% и выше общих генов (рис. 4.5.7).

Известно, что при ЛАГ в сосудистую стенку лёгочных артерий происходит активная инфильтрация иммунных клеток [Lu и др., 2023]. Также в сосудистой стенке происходят процессы ремоделирования, формирования неоинтимы, в ходе которых мигрируют, пролиферируют и образуют межклеточные контакты клетки разных типов. Группы, в которые объединены коллекции на рис 4.5.7, указывают на различные аспекты клеточных процессов и структур в клетках, участвующих в трансформации сосудистой стенки при ЛАГ.

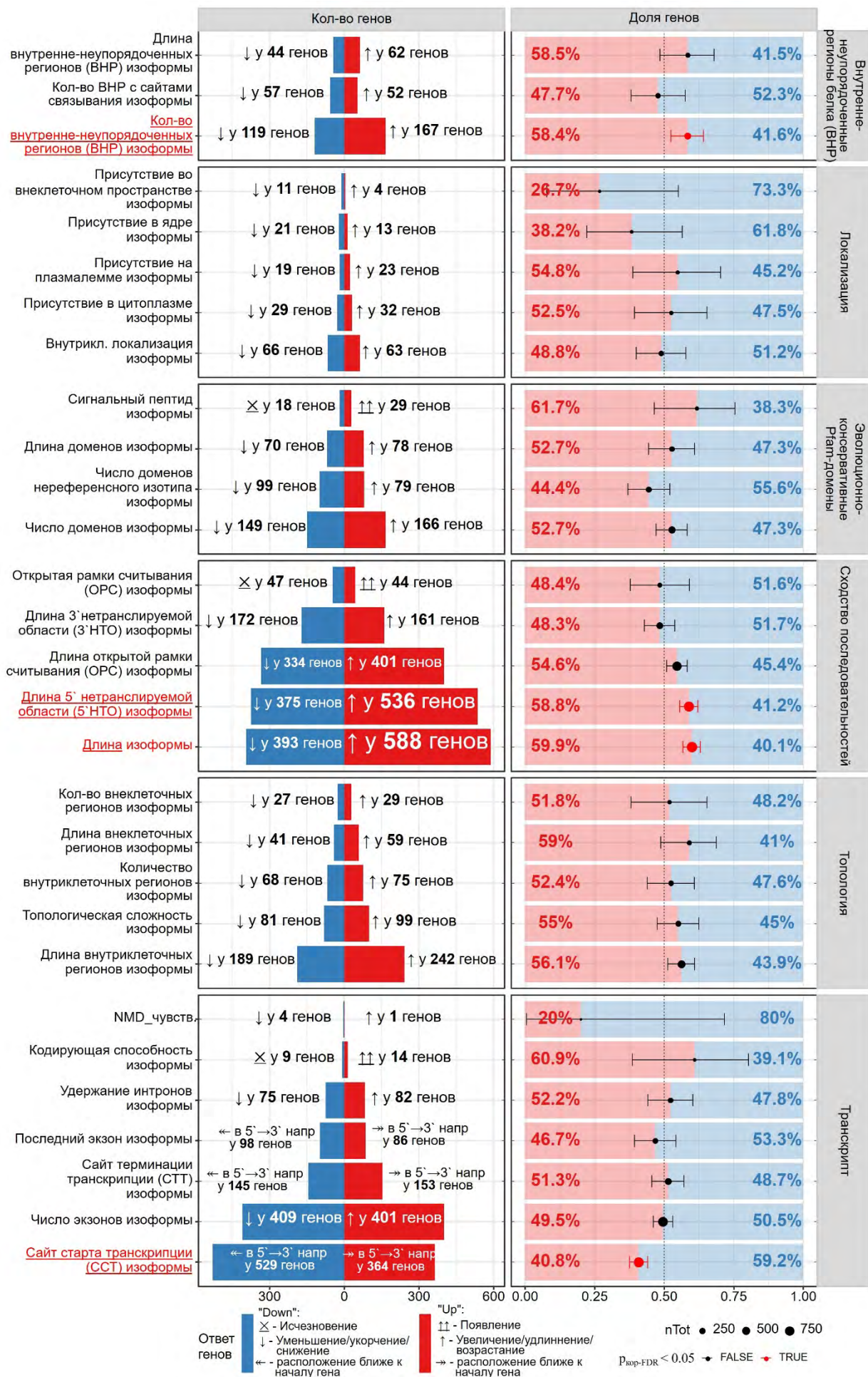


**Рис 4.5.7** Репрезентация для трёх категорий Gene Ontology (биологические процессы – BP, клеточные компоненты – CC, молекулярные функции - MF) коллекций, стат. значимо обогащенных генами, реагирующих на ЛАГ преимущественно изменением изоформенного состава. Коллекции представлены круговыми диаграммами, размер которых обозначает кол-во генов в коллекции, а сектор – долю генов, обнаруженных в коллекции при проведении анализа. Рёбра соединяют коллекции, имеющие от 10% и более общих генов. Толщина ребра отражает кол-во общих генов у коллекций, которые это ребро соединяет. Коллекции вручную объединены в группы «по смыслу».

Известно, что лёгочный ствол, его бифуркация, а также правая и левая лёгочные артерий иннервированы нервными волокнами вегетативной нервной системы, в основном, волокнами симпатического отдела. Симпатические волокна густо иннервируют не только толщу сосудистой стенки, но также адвентицию - жировую ткань и часть соединительной ткани, которая покрывает снаружи эти магистральные сосуды [Huang и др., 2019]. Известно также, что симпатические нервные волокна способны транспортировать антероградно достаточно больше количество транскриптов. Известно, что синаптическая трансляция – т.е. трансляция антероградно перенесенных транскриптов - один из важных механизмов поддержания молекулярного состава для синапсов в аксонах и дендритах [Glock и др., 2021; Holt, Martin, Schuman, 2019], а также обеспечения синаптической пластичности [Sun и др., 2021]. Другим важным механизмом обеспечения синаптической пластичности является альтернативный сплайсинг [Fisher, Feng, 2022; Furlanis, Scheiffele, 2018], который активно осуществляется в том числе в вегетативной нервной системе при синаптической трансляции. Например, характерная для симпатических нейронов изоформа потенциал-зависимого канала  $Ca_v2.2$  (*Cacna1b*), которая появляется в результате удержания экзона e18, имеет большую амплитуду входящего  $Ca^{2+}$ -тока, чем лишённая экзона e18 изоформа  $Ca_v2.2$  [Allen и др., 2017]. Таким образом, является неудивительным, что в образцах присутствуют нервные волокна, которые могут служить источником большого количества наблюдаемых специфических для нейронов транскриптов.

#### *Анализ эффектов изоформенного переключения при ЛАГ*

Для генов, отвечающих преимущественно переключением изоформ, был проведён анализ последовательностей с определением последствий переключения (рис 4.5.8) и сплайсинга (рис 4.5.9). В результате изоформенного переключения, сопровождающего ЛАГ, значимо возрастает доля генов, у которых в транскрибируемой последовательности увеличивается количество внутренне-неупорядоченных регионов (ВНР) – до 58,4% (у 167 из 286). Внутренне-неупорядоченные регионы белка – это участки, не имеющие чёткой конформационной структуры (присутствие ВНР в белке можно предсказать по его аминокислотной последовательности).



**Рис. 4.5.8** Сводное представление изменений в характеристиках (мРНК) последовательностей транскриптов и аминокислотных (а.к.) последовательностей изоформ генов, отреагировавших преимущественным изоформным переключением. Для каждой характеристики последовательности гены разделяются на противоположенные по смыслу категории и обозначаются цветом: столбики, отражающие число генов, в изоформах которых соответствующая характеристика появляется, либо становится более выраженной, даны красным, аналогичные столбики для генов, в изоформах которых соответствующая характеристика исчезает, либо становится менее выраженной - синим. Представление изменений в характеристиках сгруппировано в 6 разделов: внутренне-неупорядоченные регионы белка (ВНР; а.к. последовательности между функциональными доменами), эволюционно-консервативные Pfam-домены (функциональные домены белка), топология (кол-во и длина внутри- и внеклеточных участков изоформы), сходство последовательностей (длина изоформы/нетранслируемых областей/рамки считывания (открытая рамка считывания - ОРС), а также её появление/утеря), локализация (исчезновение или появление изформы внутри/вне клетки, а также на плазмалемме, в цитоплазме и в ядре), транскрипт (изменения в экзон-интронном составе, а также изменения удалённости сайтов старта и терминации транскрипции от начала гена). В панелях справа представлена долевая репрезентация преобладания/дефицита генов с обозначенными изменениями в а.к. и мРНК последовательностях изоформ с той же цветовой кодировкой. Красным выделены стат. значимые изменения (биномиальный тест;  $p_{\text{корр}}(\text{FDR}) < 0,05$ ) в отношении между количествами противоположено реагирующих генов. Пунктирная линия проведена на уровне 0,5. Размер обозначает общее кол-во генов с указанными изменениями в соответствующей характеристике.

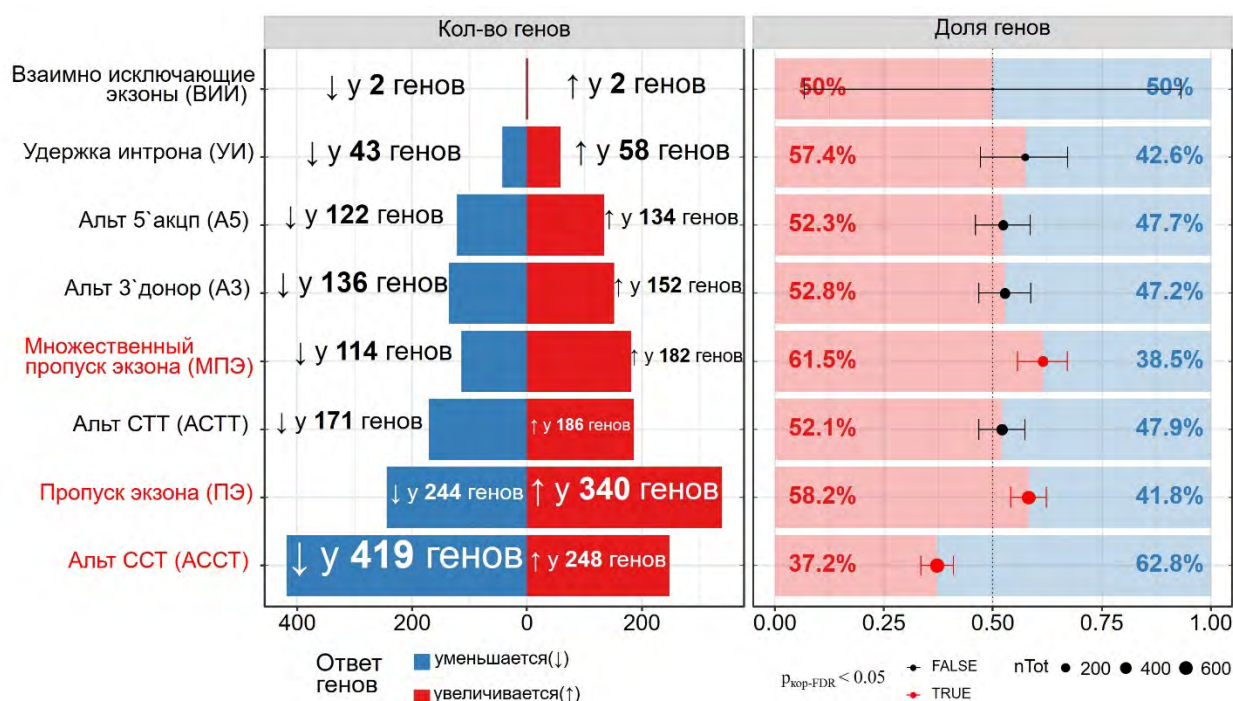
На рис 4.5.5 А приведён пример, того как в результате изоформного переключения при ЛАГ неупорядоченный регион (ВНР) начинает определяться в ряде участков аминокислотной последовательности R $\alpha$ gа-рецептора, в которых у «контрольной» изоформы определялся функциональный домен, отвечающий за контакт рецептора с коактиватором/корепрессором.

Прочие статистически значимые повышения доли генов относятся к показателям выросшей длины транскрипта и продукта гена: в результате изоформного переключения при ЛАГ выросла длина изоформы у 59,9% генов (у 588 из 981), у 58,8% генов выросла длина 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) (у 536 из 911), у 59,2% генов сайт старта транскрипции сдвинулся в 5'-направлении (у 529 из 893). Ещё два связанных с длиной показателя выросли статистически незначимо - у 54,6% генов (у 401 из 735): в результате изоформного переключения выросла длина открытой рамки считывания, а у 56,2% (у 242 из 431) - длина внутриклеточных участков.

*Анализ эффектов альтернативного сплайсинга и переключения сайтов старта транскрипции при ЛАГ*

Среди событий альтернативного сплайсинга (рис 4.5.9) в популяции генов, отвечающих преимущественным переключением изоформ – значимо повышена доля генов с пропуском экзона – 58,2% (у 340 из 582) и множественным пропуском экзона – 61,5% (у 182

из 296), при этом значимо понижена доля генов с альтернативным сайтом старта транскрипции – 37,2% (у 248 из 667). Альтернативный сайт старта транскрипции (ССТ) по определению сдвинут в 3'-направлении относительно самого первого. Известно, что у млекопитающих 2/3 генов содержат >2 сайтов старта транскрипции [Kimura и др., 2006]. Таким образом, среди 529 генов, у которых переключение изоформ происходит за счет смещения ССТ в 5'-направлении (рис 4.5.8), у 419 генов изоформы начинают транскрибироваться с самого первого ССТ (рис 4.5.9). Альтернативные ССТ для транскрипции могут задействовать разные «по силе» промоторы, регулировать интенсивность ко-транскрипционного процессинга РНК, а также регулировать транскрипцию через промотор-энхансерные взаимодействия [Alfonso-Gonzalez, Hilgers, 2024].

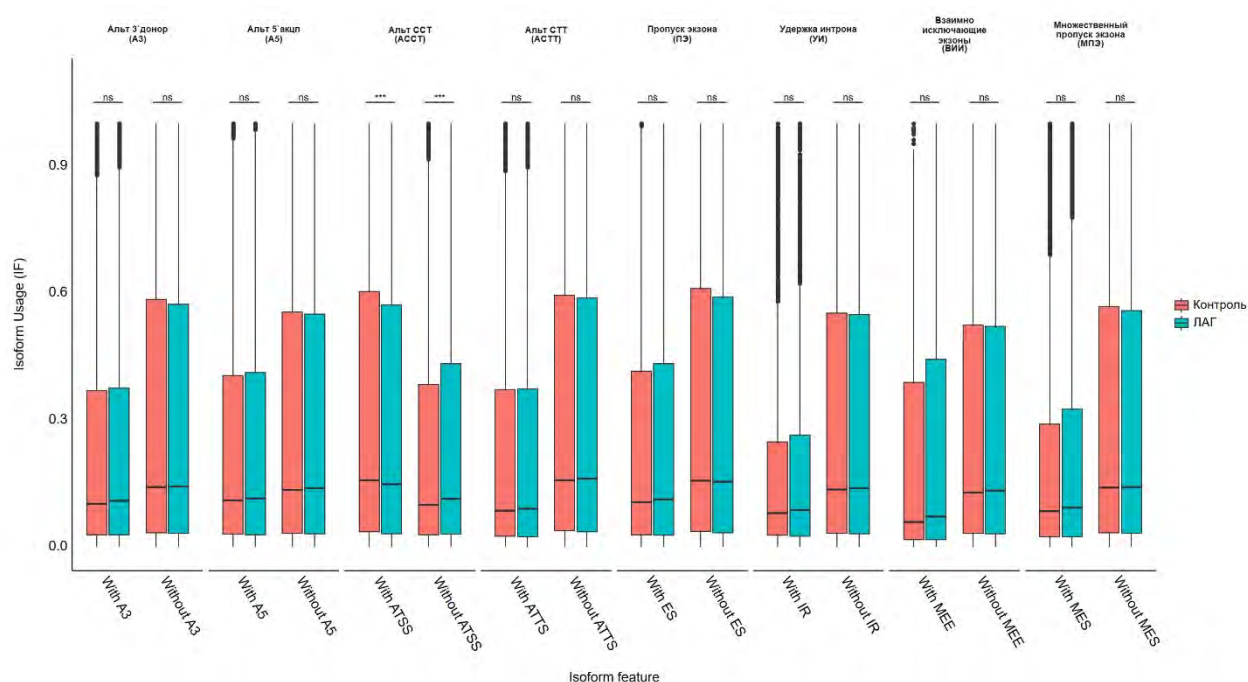


**Рис. 4.5.9** Сводное представление распространённости событий альтернативного сплайсинга среди генов, отреагировавших преимущественным изоформным переключением. Обозначения и цветовая кодировка те же, что и на предыдущем рисунке.

Альтернативные сайты старта транскрипции оказываются меньше задействованы не только для генов, отвечающих преимущественным переключением изоформ, но и в принципе для всех генов, имеющих несколько изоформ и экспрессию больше 1 гркм (рис 4.5.10). Относительная экспрессия изоформ (IF – isoform usage) с альтернативным сайтом старта транскрипции при ЛАГ статистически значимо ниже, чем в контроле. Относительная экспрессия незначимо выше при ЛАГ, чем в контроле у изоформ с пропуском экзона, множественным пропуском экзона и взаимно-исключающими экзонами. Таким образом, гены, отобранные нами для анализа по высоким значениям ИЛХ, демонстрируют более

активное использование альтернативного сплайсинга для изменения своего изоформного состава, чем вся популяция генов, за исключением генов, содержащих взаимно-исключающие экзоны.

Альтернативный сплайсинг с увеличенной долей пропуска экзонов является характерной особенностью недавно идентифицированного факультативного элемента сплайсосомы и регулятора сплайсинга Rsrp1 (рис 4.5 А). Повышение экспрессии этого белка в культуре глиобластомы мезенхимального типа приводило к aberrantному сплайсингу PARP6, и дальнейшей активации каскада NF-κB, ведущего к формированию устойчивого к апоптозу фенотипа опухоли [Li и др., 2021]. В нашем эксперименте экспрессия Rsrp1 при ЛАГ увеличена более, чем в 2 раза (рис 4.5 А).



**Рис 4.5.10** Доля изоформы с/без соответствующего события альтернативного сплайсинга в общей экспрессии гена. Красным цветом обозначен контроль, синим – ЛАГ.

Альтернативные CCT в гене способны регулировать не только транскрипционную, но и трансляционную активность транскрипта за счёт регуляторных элементов расположенных в 5'-нетранслируемой области (НТО) [Ryczek, Łuś, Makałowska, 2023]. Глобально, эффективность трансляции выше у изоформ с укороченными 5'-НТО, с низким GC-содержанием и лишенных коротких рамок считывания внутри 5'-НТО (upstream ORF - uORF) [Barrett, Fletcher, Wilton, 2013]. В тоже время 5'-НТО может содержать внутренние сайты посадки рибосомы (IRES), которые позволяют производить безкэповую трансляцию транскрипта, что может стать преобладающим способом трансляции в условиях подавления стандартной кэп-зависимой трансляции. Подавление кэп-зависимой трансляции сопровождается клеточный стресс, вызванный повреждением ДНК или

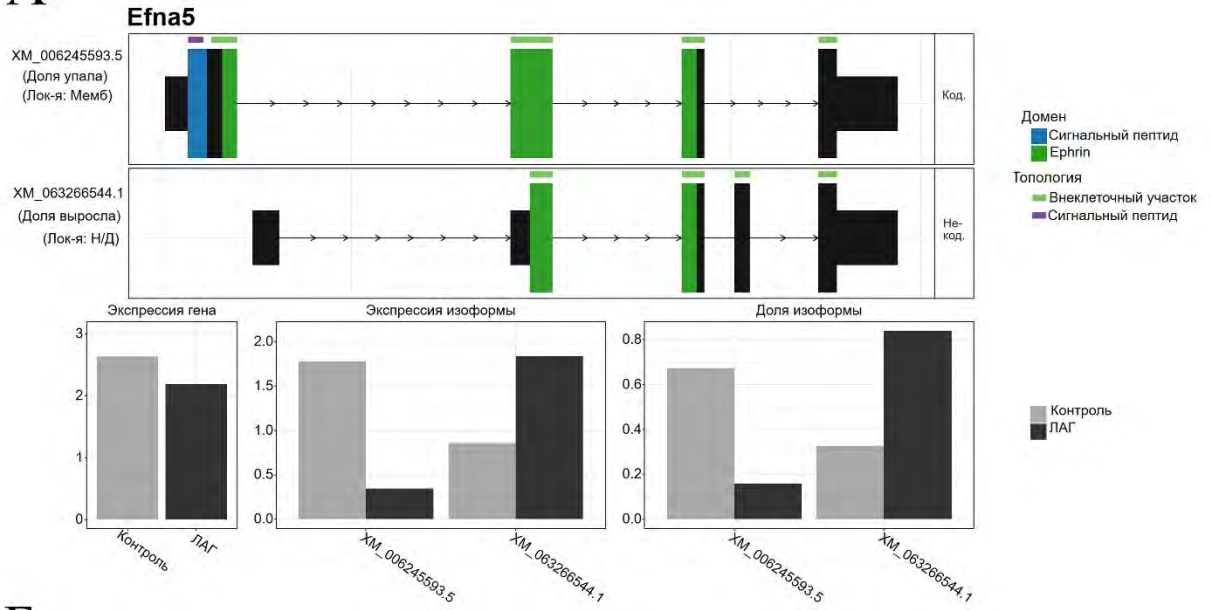
ишемией/гипоксией [Godet и др., 2019]. Альтернативная инициация безкэповой трансляции в условиях стресс-обусловленного подавления кэп-зависимой трансляции происходит с помощью коротких рамок считывания – uORF [Young, Wek, 2016]. В обычных условиях присутствие в 5'-НТО uORF чаще всего подавляет трансляцию [Barrett, Fletcher, Wilton, 2013], так например 15-нуклеотидная uORF в 5'-НТО сильно подавляет трансляционную активность транскриптов рецептора к тиреоидным гормонам  $\alpha$  – ThrA в клетках человека и лягушки [Okada, Nakajima, Yaoita, 2012].

*Анализ последствий переключения отдельных изоформ в белках, участвующих в формировании межклеточных контактов при ЛАГ*

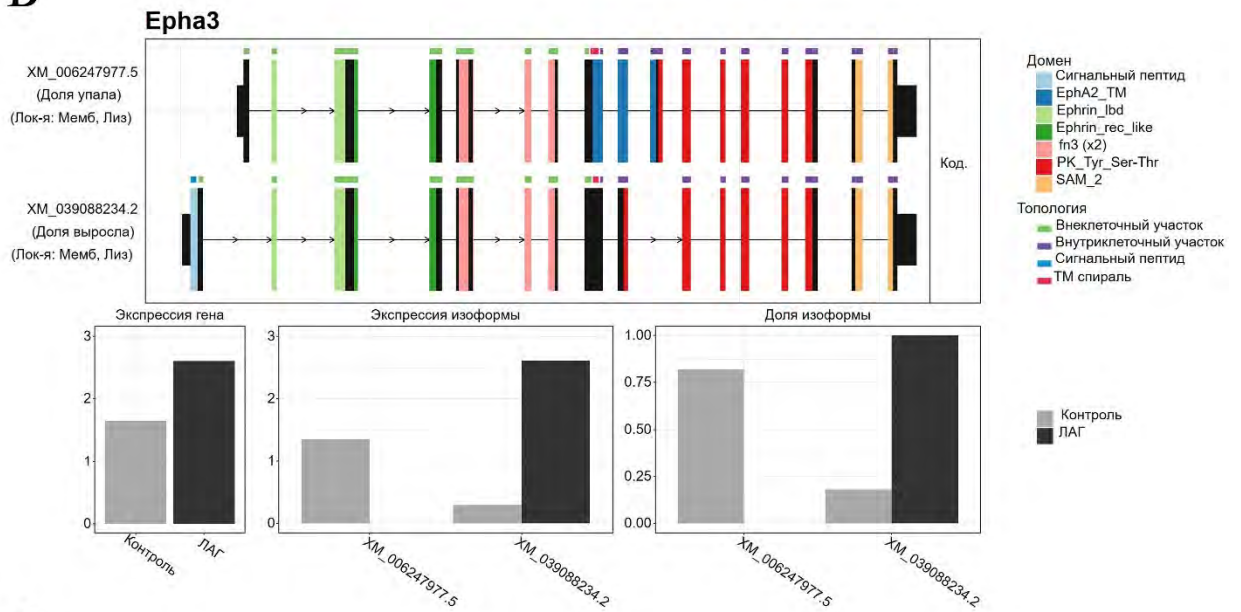
Изменения в аминокислотной последовательности функциональных доменов изоформ в результате изоформного переключения могут нарушать лиганд-рецепторные взаимодействия. На рис 4.5.11 А и Б приведена пара лиганд-рецептор - эфрин-А5 и EphA3-рецептор (Efna5 и EphA3), у каждого из которых при ЛАГ доминирует изоформа с доменными дефектами. У доминирующей изоформы лиганда эфрина-А5 наполовину уменьшен эфриновый домен (рис 4.5.11 А), а у рецептора EphA3 полностью исчез домен EphA2\_Tm (рис 4.5.11 Б), участвующий в димеризации и активации рецептора и адаптирующий эти процессы в соответствии с липидным составом мембраны [Bocharov и др., 2010]. В докинге при димеризации EphA3 и последующей активации ключевую роль играют околосмембранный цитоплазматический Tyr-602 и Tyr-779 киназного домена [Shi, Yue, Zhou, 2010]. Утрата рецептором EphA2\_Tm-домена могла не затронуть непосредственно Tyr-602, но исчезновение домена, обеспечивающего пространственную координацию между элементами димера, будет негативно влиять на эффективность сигналинга EphA3-рецептора, для которого эфрин-А5 является наиболее предпочтительным лигандом [Forse и др., 2015]. EphA3 – низкоэкспрессируемая во взрослом возрасте рецепторная тирозинкиназа, обладающая антиопухолёвым действием [Peng и др., 2016], и чаще всего мутирующая в лёгочных аденокарциномах [Ding и др., 2008]. Однако, основная роль EphA3 состоит в регуляции образования межклеточных контактов и клеточной подвижности под транскрипционным контролем эффекторов Hippo-пути Yap1 и Tead1 [Al-Mathkour и др., 2022]. Сигналинг через EphA3/эфрин-А5 опосредует рост и навигацию аксонов [Marquardt и др., 2005] и отталкивание нейритов у развивающихся нейронов [Shi, Yue, Zhou, 2010]. Другой пример, иллюстрирующий важность лиганд-рецепторных взаимодействий для молекул, опосредующих межклеточное узнавание, приведён на рис 4.5.11 В для гена нектин-3. Это также пример реакции гена, выражающейся в одновременном падении экспрессии и переключении изоформ с потерей функционального домена при ЛАГ. Nectin3 – молекула

клеточной адгезии, образуя  $Ca^{2+}$ -независимые контакты с другими нектинами и нектин-подобными молекулами клеточной адгезии, что позволяет формировать клеткам адгезионные контакты [Samanta, Almo, 2014]. Для взаимодействия нектин-3 использует иммуноглобулин-подобные V и C домены, где V-домен отвечает за узнавание и связывание, а C-домен усиливает связывание [Fabre и др., 2002]. На рис 4.5.11 В эти домены обозначены, как V-set и C2-set<sub>2</sub>. Иммуноглобулин-подобный домен у доминирующей изоформы нектин-3 при ЛАГ полностью исчез, C-домен присутствует в усечённом виде. Таким образом, реальное падение содержания функциональных изоформ нектин-3 ещё более сильное. Помимо участия в формировании адгезионных межклеточных контактов нектин-3 является лигандом иммунорецептора Tigit Т-лимфоцитов (в тч Трег, Т клеток памяти и фолликулярных Т-хелперов) [Yu и др., 2009] и натуральных киллеров [Deuss и др., 2017], подавляет их активацию и опосредует трансэндотелиальную инфильтрацию ими сосудистой стенки [Devillard и др., 2013]. Tigit принимает участие в развитии аутоиммунных патологий – так снижение экспрессии Tigit CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитами происходит при аутоиммунном полимиозите [Lai и др., 2025], тогда как при системной красной волчанке наоборот наблюдается рост экспрессии Tigit в этой популяции Т-лимфоцитов [Lai и др., 2025; Mao и др., 2017]. Таким образом, изменения изоформного состава генов при ЛАГ могут прямо влиять на межклеточные взаимодействия и опосредованную этими взаимодействиями работу иммунной системы.

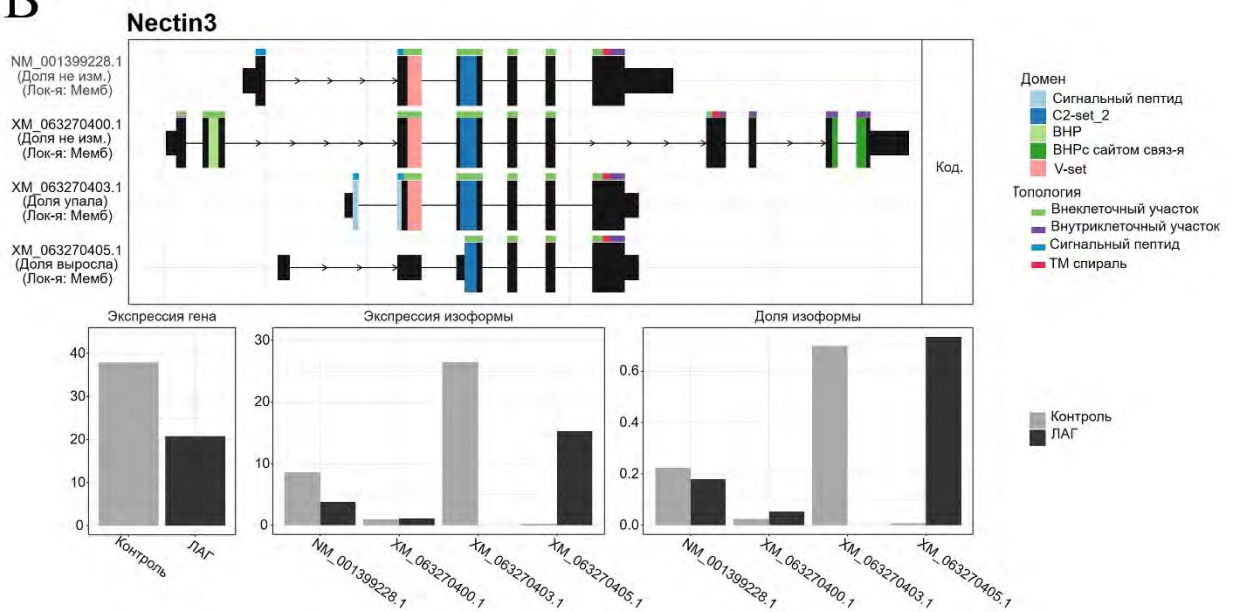
A



Б

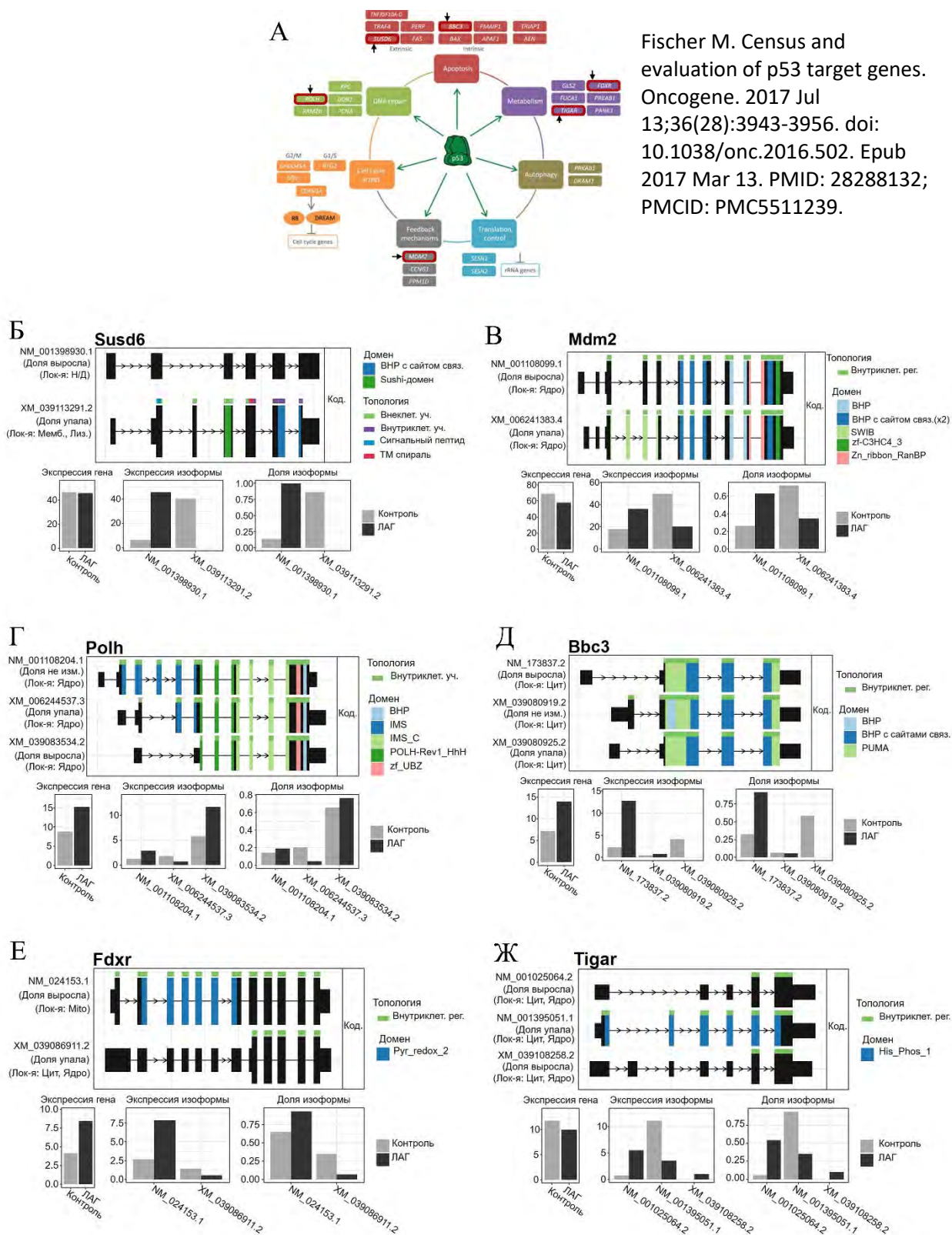


В



**Рис 4.5.11** Последствия переключения изоформ для генов, относящихся к эфриновому (А, Б) и нектинового (В) сигнальным путям. Оба пути вовлечены в направление конуса роста аксонов, формирование синапсов и поддержание нейропластичности. Nectin3 также единственный нектин, экспрессируемый Т-лимфоцитами и опосредующий трансэндотелиальный переход из сосуда в ткань. Комбинированные рисунки объединяют для гена данные экспрессии и результаты анализа последовательностей изоформ - выравненные друг относительно друга в соответствии с геномными координатами последовательности транскриптов, на которых прямоугольниками обозначены экзоны, а линиями и стрелками интроны. На последовательностях транскриптов цветом помечены обнаруженные участки белковых последовательностей - домены и внр (закрашенные участки экзонов), и топология (размечены узкой цветной полосой над экзонами). Слева для каждого транскрипта приведён его идентификатор, характеристика изменения его доли в общей экспрессии, а также локализация. А) Efna5 – ген, кодирующий эфрин-А5, который связывается преимущественно с EphA-рецепторами. В результате изоформного переключения доминирующей становится изоформа без сигнального пептида и с уменьшившимся в половину эфриновым доменом. Б) EphA3 – ген, кодирующий эфриновый рецептор А3. В результате изоформного переключения доминирующей становится изоформа без домена EphA2\_TM, который отвечает за олигомеризацию рецепторов, важную для активной передачи сигнала. В) Nectin3 – ген, кодирующий одноимённую молекулу клеточной адгезии. В результате изоформного переключения доминирующей становится изоформа без иммуноглобулинового домена V-set и с уменьшившимся доменом C2-set\_2. Оба домена участвуют в межклеточном узнавании.

*Анализ последствий переключения отдельных изоформ в белках-мишенях p53 при ЛАГ* Снижение экспрессии факторов трансляции (рис. 4.5 А) свидетельствует о рибосомальном стрессе, происходящем в ответ на повреждение ДНК[Llanos, Serrano, 2010]. Естественным клеточным ответом на повреждение ДНК является активация p53 (рис 4.5.12 А)[Fischer, 2017]. В связи с этим мы рассмотрели изменения изоформного состава для некоторых классических генов-мишеней p53 из перечня, приведённого Fischer M. et al на рис 4.5.12 А. Susd6 фигурирует в литературе, как один из внешних триггеров апоптоза (рис 4.5.12 А) [Chen и др., 2025; Polato и др., 2014]. Однако, недавно появилась работа, в которой подробно описывается механизм, с помощью которого клетки острой миелоидной лейкемии (acute myeloid leukemia - AML) избегают иммунного ответа: Susd6 уменьшает экспонирование на поверхности МНС-I (главного комплекса гистосовместимости 1) путём образования тримолекулярного комплекса с другим трансмембранным белком Tmem127, рекрутирования E3-убиквитин-лигазы Wwp2, убиквитинилирования комплекса гистосовместимости и дальнейшей деградации МНС-I в лизосомах [Chen и др., 2023]. Нокаут Susd6 замедлял рост экспериментальной опухоли из клеток АML у мышей и увеличивал их выживаемость. В нашем эксперименте наблюдается изоформное переключение, в котором функциональная изоформа Susd6 полностью заменяется на дефектную (рис 4.5.12 Б) без изменения уровня экспрессии. Таким образом, можно предполагать, что вследствие нарушения утилизации МНС-I растёт время его экспозиции на мембране, что может провоцировать развитие аутоиммунной реакции.



**Рис 4.5.12** Последствия переключения изоформ для генов-мишеней p53. А) классические гены мишени p53 (Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes. Oncogene. 2017, doi: 10.1038/onc.2016.502), сгруппированные в 7 категорий: апоптоз (Apoptosis), метаболизм (Metabolism), аутофагия (Autophagy), контроль трансляции (Translation control), механизмы обратной связи (Feedback mechanism), остановка клет. цикла (Cell cycle arrest), репарация ДНК (DNA repair). Рамками и стрелочками выделены гены, для которых ниже приведены данные экспрессии, объединённые с результатами сравнения последовательностей изоформ.

Б) *Susd6* – ген, кодирующий трансмембранный белок на, локализованный на плазмалемме, который вовлечён в ДНК-репарацию и апоптоз. Изоформное переключение приводит к преобладанию нефункциональной изоформы, при неизменном уровне экспрессии гена. В) *Mdm2* – ген, кодирующий E3 убиквитин-лигазу, связывающую p53/TP53 и опосредующую его убиквитинилирование с последующей деградацией в протеасоме. В результате изоформного переключения выросла доля изоформы, лишённой SWIB/MDM2-домена, который связывает p53/TP53. Г) *Polh* – ген, кодирующий транслезионную Pol η ДНК-полимеразу, заполняющую разрывы цепи ДНК моно- и динуклеотидными вставками. Экспрессия гена при ЛАГ выросла почти вдвое. Д) *Vbc3* – ген, кодирующий PUMA-белок (p53 upregulated modulator of apoptosis), индуцирующий апоптоз. В p53-каскаде – это обязательный индуктор апоптоза. Экспрессия гена при ЛАГ увеличена вдвое. Е) *Fdx1* – ген, кодирующий ферредоксин-редуктазу, первый переносчик электронов в цепи к цитохрому P450. Экспрессия гена при ЛАГ выросла почти вдвое. Ж) *Tigar* – ген, кодирующий фруктозо-2,6-бисфосфатазу, которая подавляет гликолиз и активирует пентозофосфатный шунт (в котором синтезируется NADH и пятиуглеродные сахара). В результате изоформного переключения доля функциональной изоформы уменьшилась до 1/3 в общей экспрессии гена.

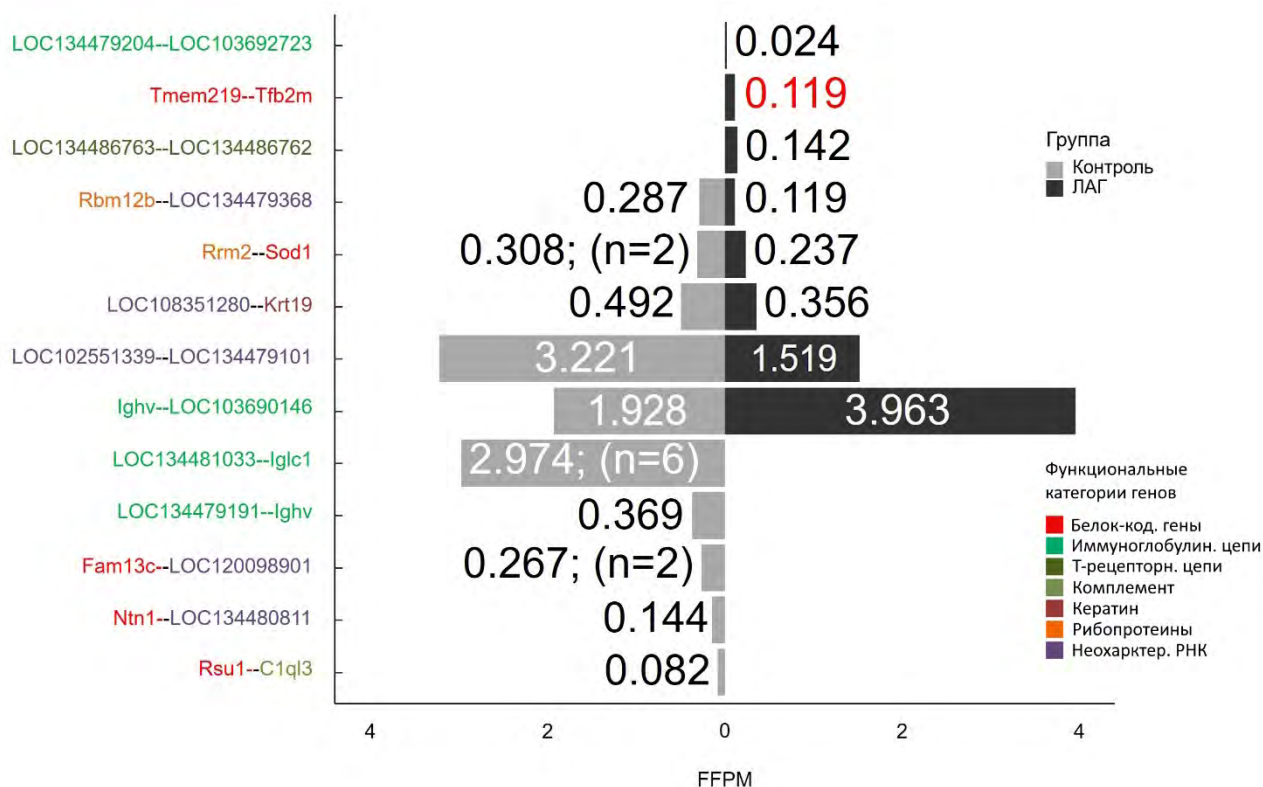
Белок *Mdm2* является E3 убиквитин-лигазой, чьей мишенью является p53. На рис 4.5.12 А она относится к механизмам обратной связи. *Mdm2* вместе со своим гомологом *Mdmx* контролируют уровень и активность p53 двумя способами – путём механического связывания с транскрипционным доменом p53 через SWIB-домен и путём убиквитинилирования p53 с помощью рекрутированных через RING-домен (zf-C3HC4\_2 на рис 4.5.12 В) E2 убиквитин-лигаз[Wade и др., 2012]. В нашем эксперименте при ЛАГ большая половина экспрессии *Mdm2* приходится на изоформу, лишённую SWIB-домена (рис 4.5.12 В). Это ведёт к накоплению несвязанного p53 и запуску транскрипции генов, которые находятся под транскрипционным контролем p53.

На рис 4.5.12 Г-Ж приведены примеры классических генов-мишеней p53, из которых экспрессия увеличивается практически в два раза у *Vbc3*, *Polh* и *Fdx1*. У каждого из этих трёх генов с выросшей экспрессией несколько изоформ, но все доминирующие при ЛАГ изоформы сохраняют функциональные домены. *Vbc3* (рис 4.5.12 Д) находится под транскрипционным контролем p53[Yu, Zhang, 2008] и кодирует классический индуктор апоптоза (рис 4.5.12 А) - *Puma*[Li, 2021]. Парадоксально, но в клетках эндотелия *Vcl3* активно экспрессируется, так как индуктор апоптоза *Puma* в этой ткани выполняет прямо противоположенную функцию – он опосредует пролиферацию и выживание эндотелиоцитов и стимулирует ангиогенез[Zhang и др., 2012a]. К пролиферации, миграции и экспрессии α-SMA лёгочными фибробластами приводит повышение экспрессии *Puma*, опосредуемое SiO<sub>2</sub>-активацией p53[Wang и др., 2015]. *Polh* (рис 4.5.12 Г) кодирует полимеразу η, которая задействована в транслезионном репаративном синтезе ДНК для преодоления участка ДНК с повреждением(рис 5.4.7 А)[Bedaiwi, Usmani, Carty, 2024].

Polh задействована в соматической гипермутации при созревании антител [Faili и др., 2009; Zeng и др., 2001]. Fdxg - ферредоксин-редуктаза (рис 4.5.12 Е), первый переносчик электронов в цепи к цитохрому P450. Ферредоксин-редуктаза вместе с ферредоксином и P450-ферментами участвует в синтезе глюко- и минералкортикоидов [Miller, Pandey, Flück, 2024] и опосредовано через ферредоксин участвует в синтезе железо-серных кластеров [Shi и др., 2012]. У Fdxg есть нефункциональная изоформа, но при ЛАГ её экспрессия уменьшается (рис 5.4.7 Е). Ферредоксин-редуктаза – представитель категории генов-мишеней p53, задействованных в клеточном метаболизме (рис 4.5.12 А). Другим представителем данной категории является Tigar (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator – индуцированный TP53 регулятор гликолиза и апоптоза). Tigar (рис 4.5.12 Ж) – фосфатаза широкого профиля, дефосфорилирующая фруктозо-2,6-бисфосфат до фруктозо-6-фосфата и таким образом регулирующая интенсивность гликолиза [Tang и др., 2021]. Фруктозо-2,6-бисфосфат является наиболее мощным аллостерическим активатором фосфофруктокиназы-1, которая в свою очередь катализирует необратимую в клеточных условиях реакцию фосфорилирования фруктозо-6-фосфата во фруктозо-1,6-бисфосфат [Mor, Cheung, Vousden, 2011]. Таким образом, интенсивностью этой реакции определяется «скорость» всего гликолиза в клетке. Содержание фруктозо-2,6-бисфосфата и таким образом интенсивность метаболизма глюкозы в клетке определяется 6-фосфофрукто-2-киназой и фрукто-2,6-бисфосфатазой [Yalcin и др., 2009]. Увеличивая интенсивность дефосфорилирования фруктозо-2,6-бисфосфата, Tigar снижает его содержание в клетке и подавляет гликолиз. Вместо гликолиза глюкоза расходуется в пентозофосфатном шунте, в котором она трансформируется в пятиуглеродные сахара, в тч рибозо-5-фосфат, с восстановлением NADH из NAD<sup>+</sup> [Bensaad и др., 2006]. Рибозо-5-фосфат и NADH – необходимые элементы для синтеза нуклеотидов и восстановления ДНК [Tang и др., 2021]. Также за счёт увеличения интенсивности восстановления NAD<sup>+</sup> в NADH растёт интенсивность работы глутатион-редуктазы, восстанавливающей окисленный глутатион (GSSG) до восстановленного (GSH), что объясняет антиоксидантный эффект Tigar [Bensaad и др., 2006; Cheung, Ludwig, Vousden, 2012]. В нашем эксперименте экспрессия Tigar уменьшается незначительно, однако в результате изоформного переключения (рис 4.5.12 Ж) содержание функциональной изоформы становится меньше половины от общей экспрессии гена. Таким образом, можно предполагать повышенную активность гликолиза при ЛАГ и, возможно, изменения в клеточных концентрациях NADH и NAD<sup>+</sup>.

#### IV.5.5 Степень и особенности нарушений транскрипции с появлением химерных транскриптов при ЛАГ

В нашем эксперименте выявлено присутствие химерных транскриптов для 10 пар генов в контроле, и для 8 пар генов при ЛАГ (рис 4.5.13), из которых 5 пар генов – общие, т.е. для них выявлены химерные транскрипты в обеих группах. В контрольной группе для трёх пар генов обнаружено несколько различных химерных транскриптов для каждой пары, в том числе для Rrm2--Sod1 (Rrm2 – регуляторная субъединица рибонуклеотид-редуктазы 2, Sod1 – супероксиддисмутаза 1). Так же в контроле ряд химерных транскриптов образован соседними генами (LOC134481033--Iglc1, Fam13c--LOC120098901 и Rsu1--C1ql3), а ещё у трёх генных пар, чьи РНК образуют химерный транскрипт, гены расположены интрахромосомно. Таким образом, в контрольной группе в 6 из 10 генных пар, чьи РНК образуют химерные транскрипты, наблюдается интрахромосомное расположение генов. Для группы ЛАГ только 3 из 8 генных пар, образующих химерные транскрипты, имеют интрахромосомное расположение, в остальных парах гены расположены на разных хромосомах. Также в группе ЛАГ не встречается генных пар, дающих несколько химерных транскриптов. Вероятно, эти отличия в экспрессии и количестве химерных транскриптов указывают на разницу в регуляции транскрипции и сплайсинга между группами. Примером такой разницы может служить генная пара Rrm2--Sod1, для которой в контрольной группе выявлено два химерных транскрипта: доминантный с наибольшей экспрессией 0.2367 ffrpm, идентичный единственному химерному транскрипту в группе ЛАГ для данной генной пары, и дополнительный, уникальный для контрольной группы с экспрессией 0.0709 ffrpm.



**Рис 4.5.13** Химерные транскрипты. Цветами обозначены функциональные категории генов, чьи транскрипты стали основой для химерных транскриптов. Если для одной и той же пары генов находилось несколько химерных транскриптов, их количество приведено в скобках, а столбики отражают суммарное значение фьюжн-фрагментов на миллион (FFPM) для данной пары генов.

Существуют два основных источника появления химерных транскриптов в клетках млекопитающих – это перестройки ДНК (инсерции, делеции, транслокации) и сплайсинг транскриптов от двух разных генов [Li, Qin, Li, 2018]. Объединение транскриптов может осуществляться посредством цис-сплайсинга соседних генов, когда два соседних гена транскрибировались в единую пре-мРНК и через транс-сплайсинг, когда объединяются отдельные транскрипты [Elfman, Pham, Li, 2020; Li, Qin, Li, 2018]. Оба варианта сплайсинга требуют готового к транскрипции хроматина и достаточной пространственной близости генов [Elfman, Pham, Li, 2020]. В группе ЛАГ полностью отсутствует цис-сплайсинг соседних генов.

Половина генов, дающих химерные транскрипты, относятся к иммуноглобулинам или компонентам Т-рецептора. Из генов, не относящихся к работе иммунной системы, интерес представляет химера Tmem219--Tfb2m в группе ЛАГ. Tmem219 – трансмембранный апоптоз-индуцирующий рецептор Igfbp3, Tfb2m – митохондриальный фактор транскрипции. Igfbp3 – лиганд Tmem219 и корегулятор ядерных рецепторов, в тч TR $\alpha$  и RXR [Varma Shrivastav и др., 2020], а также белок, самостоятельно выступающий в качестве транскрипционного фактора [Oufattole и др., 2006], демонстрирует повышенную экспрессию при ЛАГ (рис 4.5 А). Tfb2m запускает транскрипцию митохондриальных генов окислительного фосфорилирования и находится под непрямым транскрипционным контролем тиреоидных гормонов [Sagliocchi и др., ]. Таким образом, присутствие химерного транскрипта этих двух генов при ЛАГ свидетельствует в пользу изменения регуляции транскрипции тиреоидными гормонами.

## **V. ОБСУЖДЕНИЕ**

### **V.1. Ослабление вазоконстрикторных реакций, вызванных активацией альфа-1-адренорецепторов в большом круге кровообращения**

В данной работе впервые проведено исследование реактивности сосудистого русла большого круга кровообращения *in vivo* в хронической модели ЛАГ. Впервые показано, что легочная артериальная гипертензия вызывает изменение вазоконстрикторных ответов в системном круге кровообращения, индуцированных активацией  $\alpha 1$ -адренорецепторов: ЛАГ уменьшает длительность прессорной реакции, ослабляет способность сосудов большого круга поддерживать тонус и САД на высоком уровне. Впервые прямо продемонстрировано, что легочная гипертензия приводит к изменению чувствительности сосудов большого круга к ангиотензину II; при ЛАГ АП II не усиливает вазоконстрикторные эффекты, обусловленные стимуляцией  $\alpha 1$ -АР, но наоборот, уменьшает величину констрикторного ответа в большом круге кровообращения. В то же время в нашей работе показано, что NO-зависимая вазодилатация и снижение САД в большом круге в хронической модели ЛАГ остаются неизменёнными. Это наблюдение позволяет предположить, что ЛАГ оказывает преимущественное влияние на отдельные компоненты регуляции сосудистого тонуса в большом круге.

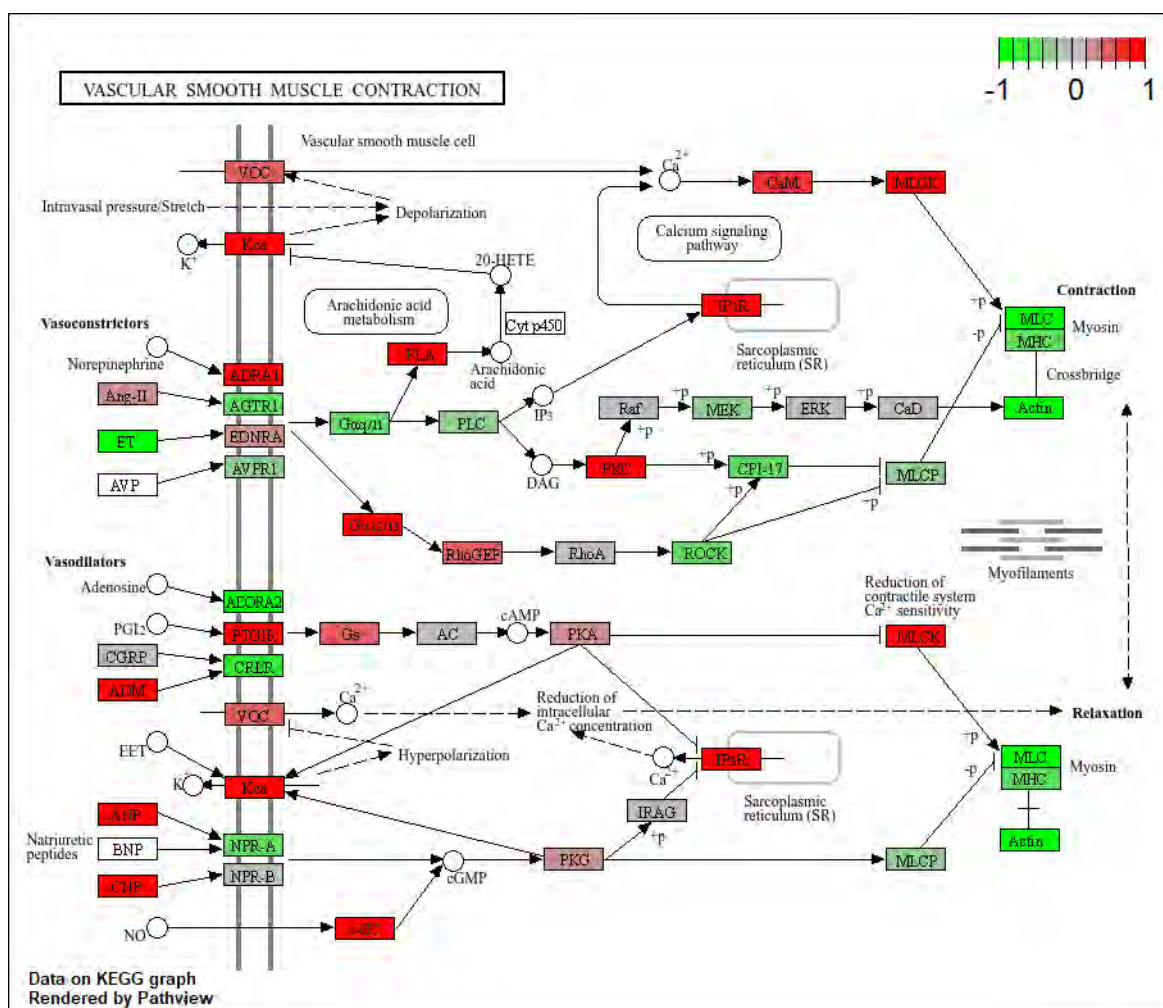
#### **V.1.1. Потенциальные молекулярные механизмы, обуславливающие изменение вазоконстрикторных реакций при ЛАГ**

В данной работе впервые, на основе транскриптомных данных, предпринята попытка установления молекулярных механизмов изменения вазоконстрикторных реакций при ЛАГ, а также чувствительности сосудистого русла большого круга к АП II.

С математической точки зрения объекты (коллекции) базы данных KEGG, использованные для анализа в данной работе, представляют из себя направленные графы с рёбрами и вершинами. Рёбра графа отражают тип и силу взаимодействия между элементами (вершинами), например, регуляторным белками. Т.о. значительная часть коллекций KEGG кодирует схемы сигнальных и/или метаболических сетей, для которых существует ясная биологическая интерпретация. Примером может служить коллекция «vascular smooth muscle contraction» (сокращение гладких мышц сосудов), представленная на рис 6.1. Процессы сокращения-расслабления гладкомышечной клетки представлены в виде взаимодействий между сократительными элементами, их регуляторами и элементами, участвующими в проведении сигнализации. В наших экспериментах выявлено, что при ЛАГ экспрессия снижена у сократительных элементов – актина и миозина, а также у фосфатазы лёгких цепей миозина (MLCP), но ещё сильнее снижена экспрессия у негативных регуляторов фосфатазы MLCP – ROCK (RhoK $\alpha$  - ROCK2) и CPI-17. Экспрессия киназы лёгких цепей миозина

(MLCK), а также ряда элементов  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаза (CaM – кальмодулин, IP3R – инозитол-3-фосфатные рецепторы), наоборот, увеличена. Также увеличена экспрессия позитивных регуляторов сокращения фосфолипазы A2 (Pla2g4a) и протеинкиназы Ca (Prkca). Сокращение ГМК определяется соотношениями активностей MLCK и MLCP [Тарасова, Гайнуллина, 2017; Moreno-Domínguez и др., 2013]. В нашем эксперименте при ЛАГ повышена экспрессия MLCK и понижена экспрессия MLCP, однако, в данном случае, интенсивность и длительность сокращения будет определяться активностью ROCK2 и CPI-17, которые совместно негативно регулируют MLCP [Тарасова, Гайнуллина, 2017; Moreno-Domínguez и др., 2013]. При этом фосфорилирование CPI-17 осуществляемое PKC опосредует быструю  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую фазу сокращения, тогда как для последующей, продолжительной и  $\text{Ca}^{2+}$ -независимой необходимо продолжительное фосфорилирование CPI-17, осуществляемое ROCK2 [Тарасова, Гайнуллина, 2017; Dimoroulos и др., 2007]. Однако, помимо участия в процессе сокращения ГМК белок CPI-17 задействован в регуляции транскрипции MEF2C [Pagiatakis и др., 2012]. При повреждении эндотелия и формировании неоинтимы происходит переключение ГМК с сократительного фенотипа на синтетический с транслокацией CPI-17 в ядро и увеличением пролиферативной активности гладкомышечных клеток [Ето и др., 2013]. В то же время в ГМК неоинтимы снижена как экспрессия CPI-17, так и экспрессия маркёров сократительного фенотипа ГМК - MLCP и гладкомышечного  $\alpha$ -актина [Kim и др., 2009]. Вместе с тем CPI-17 совместно с MEF2C в ГМК активируют транскрипцию миокардина и других генов, которые относят к сократительному фенотипу ГМК [Pagiatakis и др., 2012]. Экспрессия CPI-17 и гладкомышечного  $\alpha$ -актина в ГМК подавляется через PDGF/ERK<sub>1/2</sub>/SP1 путь, тогда как активация экспрессии CPI-17 происходит через TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ /p38/Sp3 [Kim и др., 2012]. PDGF – мощный и селективный индуктор смены фенотипа ГМК с сократительного на синтетический, который синтезируется и выделяется в том числе самими ГМК и эндотелием [Owens, Kumar, Wamhoff, 2004b]. В нашем эксперименте при ЛАГ снижена экспрессия PDGF-B и рецепторов к ним, но повышена экспрессия PDGF-A и соответствующих рецепторов.

Смена фенотипа ГМК в образцах лёгочного ствола и магистральных лёгочных артерий, в результате которого уменьшается активность в цитоплазме ключевых регуляторов MLCP – RhoK $\alpha$  и, в особенности, CPI-17 – хорошо объясняет наблюдаемую в экспериментах с бодрствующими крысами потерю способности к поддержанию длительного сосудистого тонуса БКК в ответ на прессорный стимул (ФЭ), которая выражается в уменьшении  $T_{\Delta\text{CaD50}}$ . При этом  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая часть сокращения не страдает, поэтому ФЭ-индуцированная максимальная амплитуда повышения давления ( $A_{\text{max}}$ ) не меняется.



**Рис.6.1.** Изменение экспрессии компонентов, вовлеченных в регуляцию тонуса сосудистых гладкомышечных клеток в препарате общего лёгочного ствола и обеих магистральных лёгочных артерии при ЛАГ.

При ЛАГ экспрессия элементов проведения сигнала от мембранных рецепторов к ЭПР, запускающая выброс Ca<sup>2+</sup> в цитоплазму (G<sub>12/13</sub>, PLC на рис 6.1), снижена, тогда как увеличивается экспрессия белков цитоплазмы, участвующих в расслаблении - растворимой гуанилатциклазы (s-GC), протеинкиназы А (PKA), которая тормозит MLCK, и PKG, которая увеличивает активность MLCP. Вместе с белками цитоплазмы, участвующими в расслаблении, увеличена экспрессия PTGIR – мембранного рецептора к простагландину I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), а также G<sub>s</sub>-белка, активирующего аденилатциклазу (АЦ) и, далее, через повышение [цАМФ], PKA. PGI<sub>2</sub> через активацию PKA вызывает устойчивую вазорелаксацию, тормозит пролиферацию эндотелия и ГМК, а также оказывает выраженное противовоспалительное и отчасти иммуносупрессорное действие, подавляя экспрессию многих провоспалительных медиаторов[Zeng и др., 2023]. В силу благоприятных эффектов на сосудистый артериальный тонус в малом круге разработаны синтетические миметики PGI<sub>2</sub> с разными способами доставки.

Иммунный аспект действия PGI<sub>2</sub> более комплексный: одновременно с подавлением экспрессии медиаторов воспаления PGI<sub>2</sub> регулирует дифференцировку регуляторных Т-лимфоцитов – так, антиген-презентирующие дендритные клетки, обработанные синтетическим аналогом PGI<sub>2</sub>, илопростом, активировали антиген-специфическую дифференцировку Treg[Wong и др., 2020].

### **V.1.2. Потенциальные молекулярные механизмы, обуславливающие снижение чувствительности к АТII при ЛАГ**

В текущей работе показано, что эффекты АТII, одного из наиболее значимых проконстрикторных медиаторов, изменены в большом круге кровообращения при легочной артериальной гипертензии. Ангиотензин II уменьшает и ГЛСАД<sub>1/2</sub>, но не Амах у животных с ЛАГ. Таким образом, ЛАГ подавляет и, возможно, инвертирует потенцирующее действие АТII на прессорные реакции, вызванные ФЭ в большом круге кровообращения. В основе данного эффекта может лежать несколько механизмов включающих изменение уровня экспрессии рецепторов АТ II в ГМК артерий, разобщение сигнальных каскадов  $\alpha 1$ -АР и рецепторов АТII.

Тип образцов и тип транскриптомных данных лишает нас возможности прямо делать какие-либо утверждения относительно молекулярных изменений в системных резистивных артериях, совокупным тонусом которых определяется давление в БКК. В тоже время можно предположить, что наблюдаемый при ЛАГ нейрогормональный дисбаланс будет оказывать до определённой степени сходное влияние на процессы ремоделирования и состав сосудистой стенки в обоих кругах кровообращения. Если считать, что основные изменения в транскрипционной активности клеток артериальной сосудистой стенки индуцируются колебаниями гормонов в рамках нейрогормонального дисбаланса по мере развития ЛАГ, то с определёнными оговорками мы можем экстраполировать транскрипционные изменения в магистральных лёгочных артериях на таковые в резистивных артериях БКК для объяснения наблюдаемых изменений в экспериментах *in vivo*.

Помимо нейрогормонов и АТII, который стимулирует миграцию и пролиферацию ГМК[Esteban и др., 2011; Nolze и др., 2021], а также и клеточное старение через АТ1-рецепторы[Min и др., 2009], на состояние и состав клеточной стенки будут влиять тиреоидные гормоны (ТГ)[Ichiki, 2016] и тиреоид-стимулирующий гормон (ТСГ)[Tian и др., 2014]. Повышение уровня ТСГ приводит к эндотелиальной дисфункции[Liu и др., 2018] и провоцирует пролиферацию и фенотипическое переключение артериальных ГМК[Xie и др., 2024]. На состояние клеток в сосудистой стенке и сосудистый тонус будут влиять и сами тиреоидные гормоны, как при гипо-, так и при гипертиреозе, регулируя транскрипцию генов-

мишеней по геномному и негеномному путям [Селиванова, Тарасова, 2020; Davis, Goglia, Leonard, 2016; Ichiki, 2016]. Тиреоидные гормоны по негеномному пути стимулируют пролиферацию эндотелиоцитов через  $\alpha\beta 3$ -интегрины и ERK1/2 киназу [Davis, Davis, Mousa, 2009]. В модели ангиопролиферативной ЛАГ частичная тироидэктомия уменьшала симптомы лёгочной гипертензии и облитерацию сосудистого русла [Husseini и др., 2012]. При гипотиреозе у пациентов наблюдается утолщение интимы и медики [Nagasaki и др., 2003], ассоциированное с ростом экспрессии микроРНК 21 [Zhang и др., 2014]. В тоже время Т3 активирует экспрессию адреномедуллина в эндотелии и ГМК [Ichiki, 2016; Imai и др., 1995; Isumi и др., 1998]. Тиреоидные гормоны увеличивают экспрессию натрийуретических пептидов [Christ-Crain и др., 2005; Schouten и др., 2012], но Т3 подавляет экспрессию рецептора к ANP - NPR-A [Nagaraj, Vellaichamy, 2024]. Также тиреоидные гормоны подавляют через TR $\alpha$  экспрессию основного рецептора к АП II AT1R в ГМК [Neggazi и др., 2019].

Ранее показано, что ANP/GC-A/PKG-I-зависимое фосфорилирование белка RGS-2 приводит к его активации. Фосфорилированный RGS-2 ингибирует рецепторы ангиотензина первого типа за счет прямого взаимодействия с N-концевой областью [Kishimoto и др., 2011; Matsuzaki и др., 2011]. Гипотетически, ослабление либо инверсию потенцирующего действия АП II при ЛАГ можно объяснить ANP/RGS-зависимым ингибированием рецепторов ангиотензина. Таким образом, подавление экспрессии и активности AT1R, вызванное активацией тиреоидной оси и накоплением натрийуретических пептидов, может являться причиной наблюдаемого снижения ответа на АП II при ЛАГ.

Следует отметить, что роль тиреоидной оси в контроле чувствительности к АП II при ЛАГ не столь однозначна. В нашем эксперименте при ЛАГ повышена экспрессия ANP и CNP и снижена экспрессия NPR-A (рис 6.1), что в соответствии с литературными данными свидетельствует в пользу гипертиреоза. На модели гипертиреоза у крыс, вызванной L-тироксинном, вызванная фенилэфрином вазоконстрикция колец аорты была снижена в сравнении с таковой в контроле [Pantos и др., 2001; Pappas и др., 2009]. Между концентрациями тиреоидных гормонов и натрийуретических пептидов в крови существует отрицательная обратная связь на уровне клеток щитовидной железы - рост содержания ANP в кровотоке подавляет экспрессию тироглобулина, общего предшественника тиреоидных гормонов, а также транспорт иода в фолликулярные клетки [Costamagna и др., 2002]. В клетках глии натрийуретические пептиды через NPR-A и NPR-B рецепторы и увеличение цитоплазматического [цГМФ] увеличивали активность и экспрессию основной клеточной дейодиназы DIO2 [Gondou и др., 1998], которая переводит тироксин в трийодтиронин. В нашем эксперименте наоборот наблюдается сильное падение экспрессии DIO2 (рис 5.1.3 B),

которое происходит, несмотря на перерастяжение правого предсердия, при котором стимулируется выброс ANP в кровоток. Причины такой мощной транскрипционной репрессии DIO2 не ясны.

### **V.1.3. Потенциальные молекулярные механизмы, обуславливающие стабильность дилатационных ответов сосудов большого круга на NO при ЛАГ**

Несомненно, проконстрикторное влияние ЛАГ в большом круге может реализовываться, помимо прочих механизмов, за счет «перехвата» и инактивации NO активными формами кислорода, продукцию которых НАДФ-оксидазами стимулирует АТФ. Таким образом, антиконстрикторное поток- и NO-зависимое действие эндотелия при ЛАГ может быть снижено. Как указано выше, в нашей модели ЛАГ САД в покое у контрольных крыс и крыс через 4 недели после индукции ЛАГ оставалось на сопоставимом уровне. Возможно, что наблюдаемое отсутствие изменения САД обусловлено установлением некоего баланса, возникающего в результате АФК-зависимого подавления продукции NO с одной стороны, и повышением чувствительности ГМК к NO с другой стороны.

Тем не менее, в наших экспериментах введение донора NO приводило к одинаковому снижению САД у контрольных крыс и крыс с ЛАГ; в нашей модели ЛАГ не влияет на длительность периода восстановления САД, после его снижения вызываемого донором оксида азота. Таким образом, увеличения чувствительности сосудистого русла непосредственно к самому NO не наблюдалось. Данный феномен может быть объяснен наблюдаемым повышением секреции натрийуретического пептида С-типа (CNP) и рассмотрением его эффектов, опосредованных рецепторами NPR-B. Известно, что экспрессия и секреция CNP крайне высока в сосудистом эндотелии; высвобождаемый конститутивно или в ответ на увеличение напряжения сдвига CNP стимулирует накопление cGMP, как и другие натрийуретические пептиды, в эндотелиальных клетках и ГМК. Известно, что активация сигнального каскада CNP/NPR-B/cGMP/PKG приводит к вазодилатации и/или антиконстрикторным эффектам. Кроме того известно, что CNP может стимулировать NO-синтазу и, соответственно, синтез NO, несколькими путями. Повышенная экспрессия CNP коррелирует с, типичной для ЛАГ, дисфункцией почек. CNP, высвобождаемый локально в эндотелии, может являться фактором, компенсирующим недостаточность поток-зависимой дилатации при ЛАГ независимо от продукции оксида азота.

### **V.1.4. Факторы, опосредующие изменение чувствительности к напряжению сдвига при ЛАГ**

Важным регулятором фенотипического переключения ГМК выступают экстраклеточные везикулы, наполненные специфическими микроРНК и белками, которые отшнуровывает и выбрасывает эндотелий [Boyer и др., ], выступающий сенсором напряжения сдвига и реагирующий на него изменением экспрессии индукторов смены фенотипа ГМК – PDGF-BB, TGF- $\beta$ 1 и ERK1/2[Qi и др., 2011]. Эндотелиоциты выступают в качестве главных механосенсоров потока и давления в сосудах и реагируют на напряжение сдвига, определяя его интенсивность с помощью гликокаликса и первичной реснички (primary cilia), суммируют действующие на них силы и передают сигнал через цитоскелет белкам-регуляторам метаболизма и транскрипции, а также напрямую на ядерную оболочку, деформируя её и, тем самым, механически дополнительно регулируя транскрипционную доступность хроматина для транскрипционных факторов, распознающих SSRE-последовательности ДНК (shear stress response element – элементы, активируемые напряжением сдвига)[Hierpen, Mendez, Knaus, 2020]. Межклеточные контакты эндотелиальных клеток и контакты с сосудистым матриксом являются точками передачи механических усилий на эндотелиоциты, а также участками, с которых запускается проведение сигнала через TGF- $\beta$  и BMP, регулирующие проведение механических усилий в клетку, их конвертацию в транскрипционный и метаболический ответ [Hierpen, Mendez, Knaus, 2020]. Активность сигналинга через TGF- $\beta$  и связанное с этим ремоделирование сосудистой стенки при ЛАГ можно предполагать повышенным в связи с уменьшенной экспрессией Pteral (рис 4.5) – регулятора TGF- $\beta$ -опосредованной сигнализации [Zhu и др., 2023]. Одним из белков, обнаруженных в эндотелиальных экстраклеточных везикулах был Hmgb1 - обработка ГМК везикулами с Hmgb1 вызывала повышение экспрессии ассоциированной с воспалением молекулы адгезии Vcam1, тогда как везикулы от клеток эндотелия с нокдауном Hmgb1 приводили к уменьшению экспрессии Vcam1 в культуре ГМК [Boyer и др., ]. В нашем эксперименте также наблюдается уменьшение экспрессии Hmgb1 (рис 5.1.1 В, «extracellular space») и Vcam1 (рис 4.5 А).

## **V.2. Дисфункция барорефлекторной регуляции при ЛАГ**

В наших экспериментах впервые прямо продемонстрировано, что ЛАГ оказывает существенное, комплексное влияние на барорецепторную регуляцию ЧСС.

### **V.2.1. Дисфункция барорецепторной регуляции ЧСС при ЛАГ**

В наших экспериментах установлено, что при ЛАГ у крыс наблюдается уменьшение рефлекторной тахикардии, а наибольшая достижимая ЧСС меньше, чем у контрольных животных. Т.о. ЛАГ ослабляет способность к рефлекторному увеличению ЧСС в ответ на

снижение среднего артериального давления, вызванного вазодилатацией системных сосудов за счет NO-зависимых механизмов.

У крыс с ЛАГ практически не уменьшается способность к рефлекторному снижению ЧСС в ответ на вазоконстрикцию, вызванную стимуляцией  $\alpha 1$ -адренорецепторов: рефлекторная брадикардия и наименьшая достижимая ЧСС при ЛАГ остается такой же, как и в контрольных условиях (группах). Следует отметить, что при ЛАГ, в условиях монокроталиновой модели заболевания у крыс, не наблюдается существенного изменения амплитуды вазоконстрикторного ответа системных артерий на введение ФЭ и активацию  $\alpha 1$ -АР, хотя наблюдается заметное снижение способности артерий большого круга поддерживать тонус [Абрамов и др., 2023]. Таким образом, ЛАГ вызывает большее нарушение тех механизмов и компонентов барорецепторной реакции, которые способствуют повышению ЧСС (при снижении САД) и меньшее нарушение тех, которые приводят к снижению ЧСС (при росте САД) – ЛАГ вызывает «несимметричное» изменение кривой БРР, «искажая», в большей степени симпатическую компоненту барорефлекса.

Как результат снижения ЧССтах и ТК<sup>БРР</sup> у крыс с ЛАГ наблюдается существенное уменьшение диапазона барорецепторной регуляции. ЛАГ приводит к тому, что животные теряют способность к быстрой, рефлекторной стабилизации ЧСС при снижении САД. Следует отметить, что в наших экспериментах ЧСС покоя у «здоровых» животных и животных с ЛАГ оставался одинаковым. Важно, что через 4 нед после введения МКТ и манифестации симптомов ЛАГ у крыс САД остается на прежнем уровне. Кроме того, NO-зависимая вазодилатация в большом круге в хронической модели ЛАГ вероятно остаётся неизменной, несмотря на повреждение и дисфункцию эндотелия в малом круге кровообращения: снижение САД посредством активации NO-зависимых механизмов у контрольных животных и животных с ЛАГ оказывается одинаковым. При неизменной величине NO-зависимой вазодилатации уменьшение барорефлекторного роста ЧСС может происходить за счет снижения «тонуса» симпатического отдела ВНС или чувствительности к симпатическим факторам. Как указано выше, при ЛАГ наблюдается сниженная экспрессия  $\beta$ -адренорецепторов 1 и 2 типа. По всей видимости, именно снижение экспрессии  $\beta$ -адренорецепторов сердца играет ключевую роль в уменьшении рефлекторной тахикардии и диапазона барорефлекторной регуляции.

В наших экспериментальных условиях формирование ЛАГ сопровождается повышением уровня экспрессии натрийуретических пептидов (ANP, CNP). Для ЛАГ характерно повышение экспрессии рецепторов натрийуретических пептидов, являющихся гуанилатциклазами. Симпатическая иннервация, включающая НА и адренорецепторы, а также система натрийуретических пептидов и их рецепторов являются двумя ключевыми и



### *V.2.3. Парасимпатический компонент барорецепторного контроля ЧСС при ЛАГ*

Известно, что артерии малого круга кровообращения помимо симпатической имеют также интенсивную парасимпатическую иннервацию [Birkenfeld и др., 2006; Vaillancourt и др., 2017].

Известно, что симпатическая денервация ослабляет симптомы ЛАГ. Хирургическое удаление жировой ткани с наружных стенок лёгочного ствола и бифуркации лёгочных артерий с наложением специальных патчей, препятствующих симпатической реиннервации, значительно облегчает гемодинамические проявления экспериментальной ЛАГ у крыс [Huang и др., 2019]. Ведётся обсуждение этой техники для пациентов с ЛАГ в связи с малой эффективностью внутрисосудистой радиочастотной катетерной денервации волокон вегетативной нервной системы, иннервирующих лёгочный ствол и бифуркацию ЛА, и необходимостью повторения процедуры из-за восстановления иннервации [Ogo, 2019].

С другой стороны установлено, что при ЛАГ активность парасимпатических постганглионарных волокон, иннервирующих артерии малого круга кровообращения снижается [Luchner, Schunkert, 2004]. В противоположность симпатическим эффектам, стимуляция парасимпатических нервов или потенцирование холинергических эффектов за счет применения ингибиторов холинэстеразы рассматривается как способ нормализации циркуляции в малом круге при ЛАГ.

. В наших экспериментах атропин приводил к типичным парасимпатолитическим эффектам, включающим повышение ЧСС покоя, уменьшение  $A_{БРР}$  за счет  $ЧСС_{min}$  и  $БК_{БРР}$ . Эти типичные эффекты наблюдались как у контрольных животных, так и у животных с ЛАГ. Как указано выше, у крыс с ЛАГ наименьшая достижимая ЧСС и рефлекторная брадикардия остаются неизменными, что позволяет предположить интактность холинергической компоненты БРР у крыс с ЛАГ. АТII незначительно влияет на парасимпатический компонент барорецепторного рефлекса у крыс с ЛАГ. Эти наблюдения подтверждают предположение о минимальной дисфункции холинергической компоненты БРР при ЛАГ.

Наши функциональные эксперименты с использованием монокроталиновой модели патологии позволяют предположить, что парасимпатическая иннервация САУ, в отличие от иннервации легочных артерий при ЛАГ остается не затронутой. Следует отметить, что парасимпатический тонус и холинергический вклад в регуляцию ЧСС у человека гораздо больше, чем у грызунов. Поэтому, дерегуляция ЧСС, обусловленная дисфункцией парасимпатического отдела ВНС у человека при ЛАГ не может быть исключена полностью.

### **V.3. Механизмы компенсаторного изменения индексов сократимости левого желудочка сердца, вызванного снижением его наполнения при ЛАГ**

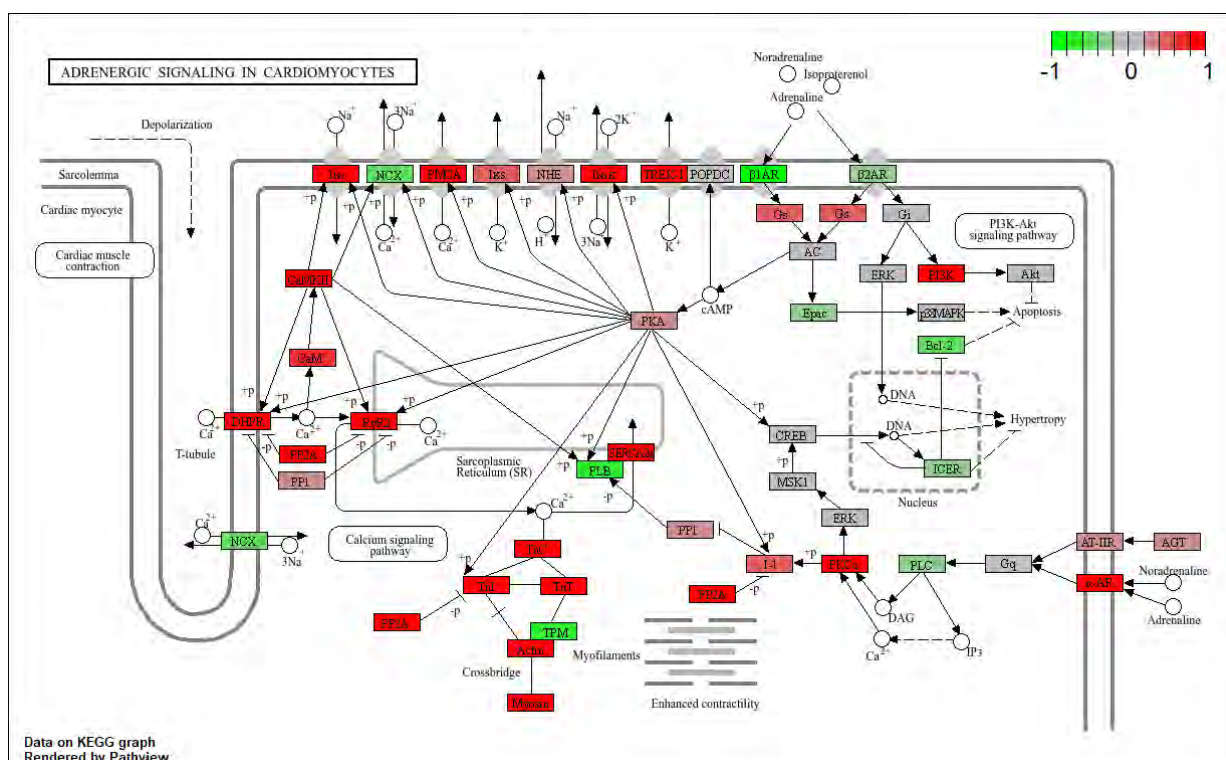
Установлено, в наших экспериментах, а также экспериментах других авторов, что ЛАГ приводит к значимому снижению сердечного выброса при постоянной ЧСС; снижению ударного объема при неизменной фракции выброса левого желудочка. В данной работе, впервые, на примере крыс, установлено, что при ЛАГ угловые коэффициенты кривых « $dP/dt_{max}$  – КДО» и « $dP/dt_{min}$  – КДО» в 1,93 и 2,5 раза больше, чем у контрольных животных. Таким образом, ЛАГ приводит к компенсаторному усилению (увеличению крутизны) зависимости сократимости, а также «интенсивности» расслабления левого желудочка от КДО.

При ЛАГ наблюдается повышение тонуса симпатического отдела ВНС, активация РААС, увеличение секреции адреналина и норадреналина. Активация сигнальных каскадов адренорецепторов в ЛЖ, могла бы быть причиной увеличения коэффициентов наклона для кривых « $dP/dt$ -КДО». Однако, наши эксперименты не сопровождались заметным ростом ЧСС, КСД, характерных для симпатoadреналовой оси. Кроме того, снижение КСО, типичное для симпатической активации, не превалировало над снижением КДО. С большой вероятностью, наблюдаемые феномены обусловлены не только и не столько повышением симпатического тонуса, а, вызванными ЛАГ и нейрогуморальным дисбалансом, структурными изменениями в ЛЖ.

Усиление активации левожелудочкового миокарда растяжением может быть связано с целым спектром молекулярных механизмов. Известно, что вызванная ЛАГ гипертрофия правого желудочка сопровождается изменением соотношения экспрессии изоформ титина в пользу менее растяжимой N2B изоформы белка. Увеличение  $dP/dt_{max}$  в ЛЖ при сниженном КДО также быть результатом повышения содержания в миофибриллах титина N2B-типа.

Объединение данных об экспрессии генов и схем сигнальных путей позволяет предположить механизмы изменения индексов сократимости миокарда левого желудочка при ЛАГ. Анализ проведен с использованием коллекции «Adrenergic signaling in cardiomyocytes» (адренергическая сигнализация в кардиомиоцитах) (рис. 6.2). Увеличение экспрессии сократительных белков при ЛАГ не затрагивает тропомиозин, экспрессия которого уменьшается. Тем не менее при ЛАГ увеличена экспрессия натриевых, калиевых и кальциевых каналов, мембранной  $Ca^{2+}$ - и Na/K-АТФаз. Вместе с увеличением экспрессии каналов увеличена экспрессия белков  $Ca^{2+}$ -транспорта и «круговорота» в саркоплазматическом ретикулуме – риандиновых рецепторов (RyR2) и кальциевой АТФазы (Serca2a), однако сильно уменьшена экспрессия у фосфоламбана Plb (на рис 6.2 А - Pln) и уменьшена экспрессия Na/ $Ca^{2+}$ -обменника. При ЛАГ увеличена экспрессия  $Ca^{2+}$ -зависимых

киназ – протеинкиназы С (РкС), кальмодулин-зависимой киназы 2 (СаМКII), а также у фосфоинозитол-3-киназы (PI3K). При этом экспрессия протеинфосфатазы 2А (PP2A) также возросла. Результатом изменений в экспрессии ключевых генов, регулирующих колебания цитоплазматического  $Ca^{2+}$ , является рост амплитуды этих колебаний и увеличение чувствительности к ним сократительных белков. Фосфоламбан оказывает тормозящее действие на *Serca2a*, которое пропадает при его фосфорилировании, так как он отсоединяется от  $Ca^{2+}$ -помпы и собирается в пентамер [Boron, Boulpaep, 2017], поэтому противоположенные изменения в экспрессии этих двух белков приведут к увеличению пула активной *Serca2a*, ускорению возвращения  $Ca^{2+}$  в цистерны СПР, а значит и к росту скорости расслабления. Увеличение количества мембранных натриевых и кальциевых каналов, а также рианодиновых рецепторов приведёт к увеличению скорости  $Ca^{2+}$ -зависимого  $Ca^{2+}$  выброса из ретикулума, а значит к росту скорости сокращения миокарда. Эти молекулярные изменения необходимы для того, чтобы компенсировать недостаток преднагрузки из-за сниженного объёма наполнения (КДО) ЛЖ. Следует отметить также, что при ЛАГ наблюдается сниженная экспрессия  $\beta$ -адренорецепторов 1 и 2 типа, но повышена экспрессия  $\alpha 1$ -адренорецептора ( $\alpha 1$ -АР). Известно, что усиление сократимости миокарда при стимуляции  $\alpha 1$ -АР является кальций-независимым и обусловлено повышению чувствительности тропонин-тропомиозинового комплекса к  $Ca^{2+}$ . Увеличение экспрессии  $\alpha 1$ -АР, вероятно, является еще одним механизмом, способствующим увеличению наклона кривой « $dP/dt_{max}$  – КДО» в левом желудочке.



**Рис.6.2.** Изменение экспрессии компонентов, вовлеченных в регуляцию сократимости кардиомиоцитов при ЛАГ.

#### **V.4. Особенности гипоксической вазоконстрикторной реакции (ГВР) в малом круге кровообращения при ЛАГ в влияние АТII на ГВР при ЛАГ**

Усиление ГВР на вторую неделю ЛАГ согласуется с литературными данными [Rosenberg, Rabinovitch, 1988]. К этому сроку в монокроталиновой модели ЛАГ происходит мускуляризация резистивных артерий третьего и четвёртого порядков. Однако, наряду с процессами мускуляризации на сроке 4 нед ЛАГ становится заметно ослабление ГВР в группе ЛАГ, которое «исчезает» после предварительной инфузии АТII. В острых экспериментах с PV-катетером на более поздних сроках ЛАГ гипоксическая проба делит группу ЛАГ на две противоположным образом реагирующие подгруппы крыс. Однако на фоне инфузии АТII группа «ЛАГ-неответчиков» демонстрирует сходные с группой «ЛАГ-ответчиков» временные и амплитудные показатели снижения КДО, что свидетельствует о «восстановившейся» ГВР. В группе «ЛАГ-ответчиков» ГВР протекает наиболее интенсивно, при этом инфузия АТII дополнительно увеличивает скорость её протекания. В противоположность обеим группам ЛАГ инфузия АТII ослабляет амплитудно-временные характеристики ГВР в контрольной группе – амплитуда и скорость снижения КДО во время гипоксической пробы на фоне инфузии АТII ниже, чем у интактных крыс. Наши наблюдения согласуются с современными представлениями о АТ-II стимулирует генерацию АФК НАДФН-оксидазами через АТ1R/c-src сигнальный путь [Man de и др., 2012; Maron, Leopold, 2014]. Все сосудистые НАДФН-оксидазы, включая NOX1, NOX2, NOX4 и NOX5 находятся под тесным контролем АТ-II [Nguyen Dinh Cat и др., 2013]. Регуляция происходит, как на уровне экспрессии – за счёт активации АТ-II экспрессии соответствующих генов [Forrester и др., 2018], так и за счёт активации транслокации p47phox в кавеолы [Soe и др., 2013]. При осуществлении ГВР падение уровня цитоплазматического АФК является событием, передающим сигнал от кислородного сенсора, в роли которого выступают митохондрии, к эффектору – K<sup>+</sup>-каналам плазмалеммы ГМК [Dunham-Snary и др., 2019]. Митохондриальная дисфункция может приводить к ЛАГ у пациентов [Xu и др., 2017]. Также вазоконстрикция и повышенное давление в лёгочной артерии и правом желудочке наблюдаются при блокаде комплекса III митохондриальной дыхательной цепи антимицином А [Rafikova и др., 2018]. В тоже время НАДФН-оксидаза является самостоятельным индуктором ремоделирования сосудистой стенки лёгочных артерий и пролиферации ГМК [Huetsch, Suresh, Shimoda, 2019]. На модели гипоксической вазоконстрикции в экспериментах на изолированных лёгких показано непосредственное участие NOX2 в формировании KCl-индуцируемой вазоконстрикции [Norton и др., 2013]. При инфузии АТ-II включается независимый от

митохондриальный источник АФК, который продолжает работать во время гипоксии. Наши результаты для интактных крыс и для крыс на второй неделе ЛАГ с этим согласуются – инфузия АТ-II оказывает тормозящее, либо даже блокирующее влияние на ГВР.

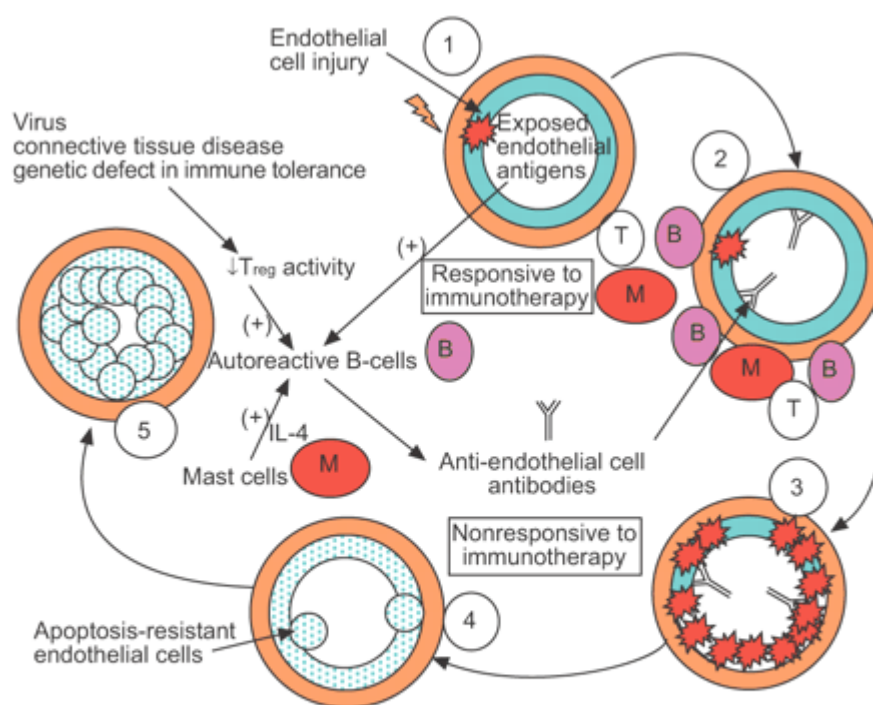
#### ***V.5. Абберантный сплайсинг как один из механизмов аутоиммунного ремоделирования сосудистой стенки при ЛАГ***

При анализе транскриптомного профиля и транскрипционных сдвигов, выполненных в данной работе, обнаружено, что экспериментальная ЛАГ сопровождается изменением экспрессии множества генов, связанных с иммунным ответом, активностью иммунных клеток. Существенное количество важнейших генов «иммунитета» не позволяет игнорировать их роль в формировании ЛАГ и возможной модификации функционирования сердечно-сосудистой системы.

Представления о вовлечении в патогенез ЛАГ адаптивного иммунитета начинают формироваться в конце прошлого века – в 1992 году появилась первая работа, связавшая лёгочную гипертензию с аутоиммунными заболеваниями [Barst и др., 1992]. С 1992 года по 2022 год, за 30 лет было выпущено 908 публикаций, касающихся тех или иных аспектов Т-клеточного иммунитета при ЛАГ, из которых половина выпущена в период с 2014 по 2022, а активный ежегодный рост количества публикаций начинается в 2005 году [Chen и др., 2024]. В 2005 году MR Nicolls (Никколлс) с соавторами публикует обзор, в котором сформулирована гипотеза о возможном механизме участия тучных клеток, В-лимфоцитов и Трег в повреждении сосудистой стенки в ходе развития ЛАГ [Nicolls и др., 2005]. Популяционное исследование (473 пациента с ЛАГ vs. 946 здоровых добровольца) проведённое в 2022 году, в котором сообщается об изменениях в размере субпопуляций В-лимфоцитов и Т-хелперов у больных с ЛАГ, а также о формировании аутоантител у 40% больных, носит название «Аутоиммунитет – значимая черта ЛАГ» (Autoimmunity is a significant feature of idiopathic pulmonary artery hypertension). Это исследование подводит своего рода итог дискуссии, которая велась с 1990-х годов [Jones и др., ]. В работе отмечается парадоксальный факт - выживаемость выше в группе больных ЛАГ с высоким и средним содержанием аутоантител, но наиболее частым фактором коморбидности в этой группе выступает гипотиреоз [Jones и др., ].

Схема «аутоиммунного» механизма ЛАГ, предложенная Николлсом и соавторами включает три ключевых этапа. На первом этапе (рис 6.4, 1 → 2) первичное повреждение эндотелия (в частности, в результате вирусной инфекции) ведет к инфильтрации сосудистой стенки иммунными клетками (В- и Т-лимфоцитами, моноцитами), а также активации резидентных тучных клеток. На втором этапе (рис 6.4, 2 → 3) В-лимфоциты формируют аутоантитела к аутоантигенам клеток эндотелия. Аутоантителообразование становится

возможным в результате повышения уровня аутоантигенов, вызванного первичным повреждением эндотелия, низкой активности Treg и высокой активностью тучных клеток. На третьем этапе растущий уровень аутоантител вызывает апоптоз эндотелиоцитов (рис 6.4, 3 → 4), одновременно с которым происходит отбор устойчивых к апоптозу клеток эндотелия. Устойчивые к апоптозу эндотелиоциты демонстрируют «квазиопухольный» фенотип: эти клетки активно пролиферируют, не ограничиваясь формированием монослоя, что способствует дополнительной обструкции сосудистого просвета (рис 6.4, 4 → 5). Вышеописанная схема впервые непротиворечиво связала наблюдаемые при ЛАГ аутоиммунные феномены.



**Рис.6.4.** Роль аутоиммунного ответа в трансформации сосудистой стенки при ЛАГ. Приведено с изменениями по Nicolls MR et al. (Taraseviciene-Stewart L, Rai PR, Badesch DB, Voelkel NF. Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective. Eur Respir J. 2005 Dec;26(6):1110-8. doi: 10.1183/09031936.05.00045705).

В экспериментальной модели ЛАГ, реализованной в данной работе, обнаруживаются признаки аутоиммунной трансформации сосудистой стенки. Так, повышенная экспрессия при ЛАГ белка Vpreb3 (рис 4.5 А) и транскрипционного фактора SpiB (рис 4.5 А, выноска), являющихся атрибутами В-лимфоцитов герминативных центров [Ott и др., 2022; Willis и др., 2017], а также значимое усиление экспрессии генов в коллекции «Antigen processing and presentation» (Kegg) свидетельствуют об активном процессе созревания В-лимфоцитов.

По данным литературы в норме В-лимфоциты редко инфильтрируют толщу сосудистой стенки – одиночные В-лимфоциты обнаруживают в неоинтимае или в плексиморфных повреждениях между клетками эндотелия [Sanges и др., 2024]. С развитием ЛАГ В-лимфоциты имеют тенденцию скапливаться в лимфоидные агрегаты, локализующиеся в периваскулярном пространстве и в адвентиции лёгочных артерий по всему артериальному дереву, а также с меньшей частотой – в перибронхиальных областях [Sanges и др., 2024]. У пациентов с ЛАГ эти агрегаты могут развиваться в полноценные лимфоузлы в процессе нелимфогенеза с признаками четвертичных лимфоидных органов. К признакам нелимфогенеза относят формирование В-клеточного фолликула, включающего в себя фолликулярные дендритные клетки в центре лимфоузла, и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты на его периферии, распределенные по компартментам при участии сети ретикулярных клеток [Perros и др., 2012; Sanges и др., 2024]. Новообразованные лимфоузлы связываются лимфатическими сосудами с сосудистой стенкой лёгочных артерий, что позволяет её антигенам свободно циркулировать через лимфоузлы, захватываться и презентироваться антиген-представляющими клетками [Perros и др., 2012]. В данной работе при монокроталиновой модели ЛАГ, несмотря на сниженную экспрессию характерной для воспаления молекулы клеточной адгезии Vcam1, обнаружено повышение экспрессии другого недавно открытого рецептора Siglec5 (рис 4.5 А, выноска). Siglec5 является рецептором, экспонируемым на поверхность только активированным эндотелием [Li и др., 2025]. Siglec5 селективно связывает новый вид недавно открытых молекул клеточной адгезии, представляющих из себя гликозилированные молекулы РНК. Глико-РНК активно экспонируются на поверхности моноцитов и опосредуют их адгезию к эндотелию [Flynn и др., 2021; Li и др., 2025]. Инфильтрация через активированный эндотелий также косвенно подтверждается увеличением экспрессии Retnlg (резистин-подобный белок  $\gamma$ ; рис 4.5 А, выноска), который ассоциирован с мигрирующими нейтрофилами [Liu и др., 2023]. Т.о. в наших экспериментах можно предполагать инфильтрацию иммунных клеток в сосудистую стенку.

Повышенная экспрессия Dnase113 (рис 4.5 А, выноска) свидетельствует о высоком уровне апоптоза в тканевых образцах сосудов от животных с ЛАГ. Dnase113 - единственной тип ДНК-азы, способной эффективно разрезать конденсированную ДНК хроматина интактных клеточных ядер, а также апоптотических телец [Sisirak и др., 2016].

Высокий уровень апоптоза и его маркеров следует ожидать при т.н. рибосомальном стрессе, возникающем в ответ на химическое повреждение ДНК. Признаком рибосомального стресса является уменьшение экспрессии некоторых факторов элонгации и биогенеза рибосом. а также элементов рибосом, включая Rp137, который напрямую взаимодействует с

главными регуляторами p53 – Mdm2 и Mdmx[Daftuar и др., 2013] (рис 4.5, А). Т.о. рибосомальный стресс стабилизирует p53 и запускает его транскрипционную программу, что манифестирует в росте экспрессии некоторых его классических генов-мишеней, наблюдаемом в наших экспериментах (рис 4.5.12).

В пользу активного процесса селекции устойчивых к клеточной гибели клеток, протекающего одновременно с апоптозом, свидетельствует повышенная при ЛАГ экспрессия регулятора сплайсинга Rsrp1. Усиление экспрессии Rsrp1 в культуре мезенхимальной глиобластомы приводит к формированию устойчивого к апоптозу фенотипа опухоли[Li и др., 2021]. В наших экспериментах при ЛАГ наблюдается повышение доли мРНК с пропуском одного и более экзонов (рис 4.5.9), что является типичным признаком усиленного в результате активации Rsrp1 альтернативного, или вернее, аберрантного сплайсинга[Li и др., 2021]. Аберрантный сплайсинг оказывает влияние на все гены, обуславливая появление, исчезновение, а также изменение длины функционально-значимых белковых доменов, предопределяя функциональность экспрессирующихся изоформ. Выявленными нами примерами могут служить изменения в изоформах генов-мишеней p53 Susd6, Mdm2 и Tigar (рис 4.5.12, Б, В, Ж).

Учитывая аберрантный сплайсинг можно предположить, что клетки, экспрессирующие модифицированные изоформы, более устойчивы к индукции апоптоза, так как Susd6 – внешний триггер клеточной смерти[Polato и др., 2014], а Tigar – внутренний [Tang и др., 2021], с большей вероятностью становятся дисфункциональными. Оснований к такому предположению становится больше, если принять во внимание, что широко известный и наиболее типичный внутриклеточный p53-зависимый индуктор апоптоза Puma действует прямо противоположенным образом в эндотелии [Zhang и др., 2012a] и в лёгочных фибробластах[Wang и др., 2015], где усиливает выживаемость клеток, пролиферацию и ангиогенез. ЛАГ приводит к запуску программ p53, но при усилении аберрантного сплайсинга и инвертированной роли Puma в эндотелии, выживаемость клеток с поврежденной ДНК увеличивается.

Таким образом, функционирование p53-пути зависит от клеточного контекста. Увеличение экспрессии нефункциональных изоформ Tigar будет приводить к преобладанию гликолитического типа метаболизма, что в условиях ослабленной работы митохондрий будет вести к лактацидозу и синдрому Варбурга - известным атрибутам опухолевых клеток. В то же время утрата функциональной изоформы Susd6 может вносить дополнительный вклад в развитие аутоиммунного ответа, увеличивая время экспозиции на клеточной мембране МНСI[Chen и др., 2023].

Усилению аутоиммунного ответа при ЛАГ может способствовать экспрессия генов эндогенных ретровирусов. Ретровирусы составляют порядка 8% от генома человека [Hughes, Coffin, 2001]. Большая их часть ретровирусных элементов неактивна вследствие мутаций, однако стрессовые условия могут активировать транскрипцию вирусных генов и трансляцию вирусных белков, что дополнительно осложняет течение оконно- и аутоиммунных заболеваний [Staege, Emmer, 2018]. Установлено, что ряд генов человеческих эндогенных ретровирусов группы К (HERV-K) при ЛАГ активно экспрессируется в эндотелии, моноцитах и В-лимфоцитах, вызывая в виде ответной реакции врождённого иммунитета экспрессию SAMHD1 (трифосфогидролаза, расщепляющая дезоксирибонуклеозид-3-фосфаты – дНТФ). Активированные В-лимфоциты интенсивно формируют аутоантитела к SAMHD1 [Saito и др., 2017]. Известно, что фермент ретровируса HERV-K дезоксиридин-3-фосфатгидролаза (дУТФаза) повышен в моноцитах и макрофагах при ЛАГ, при этом моноциты с повышенной экспрессией дУТФазы активно отшнуровывают экстраклеточные микровезикулы, которые содержат данный фермент и индуцируют эндотелио-мезенхимальный переход [Otsuki и др., ]. В эндотелии экспрессия ретровирусной дУТФазы усиливает апоптоз [Saito и др., 2017]. Введение вирусной HERV-K дУТФазы крысам в течение трёх недель вызывало гемодинамические и морфологические признаки ЛАГ [Saito и др., 2017]. В наших экспериментах при ЛАГ обнаруживается повышена экспрессия Eryk-2113 (рис 4.5 А, выноска) – это «подобный элементу 21 Env» полипротеин 3 эндогенного ретровируса группы К.

Белки оболочки эндогенных ретровирусов (envelope protein - env) существенно стимулируют аутоиммунные реакции и повреждение тканей иммунными клетками [Grandi, Tramontano, 2018; Staege, Emmer, 2018]. Один из механизмов повреждения связан с экспонированием вирусных эпитопов комплексом МНСI. Такое экспонирование стимулирует апоптоз эндотелиоцитов при участии иммунных клеток, их прямое цитотоксическое действие.

Следует отметить, что в нашей работе выявлены признаки нарушения механизма, предотвращающего гиперактивацию иммунитета, что может усиливать повреждающее действие иммунных клеток в эндотелии при ЛАГ. В частности, взаимодействие между иммунным белком-«чекпойнтом» Tigit и молекулой клеточной адгезии – нектином-3, оказывается нарушенным так как экспрессируемая при ЛАГ изоформа нектина-3 утратила иммуноглобулиновый распознающий домен вследствие аберрантного сплайсинга (рис 4.5.11 В). Таким образом, в наших экспериментах прослеживается молекулярная основа процессов межклеточного взаимодействия, приводящего к аутоиммунной трансформации стенки лёгочных артерий при ЛАГ.

## VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Легочная артериальная гипертензия сопровождается нарушением гемодинамики в малом круге кровообращения за счет ремоделирования стенки легочных артерий и правожелудочковой гипертрофии. Несмотря на то, что структурные перестройки при ЛАГ сконцентрированы в легочных артериях, ЛАГ может приводить к изменению или утрате механизмов регуляции кровотока в элементах как малого, так и системного круга кровообращения (СКК). Как установлено в многочисленных исследованиях, перестройка регуляции легочного кровотока манифестирует при длительной или терминальной ЛАГ. В представленной работе впервые исследовано влияние тяжелой формы ЛАГ на два ключевых, центральных механизма быстрой регуляции кровотока, специфических для большого и малого круга кровообращения, и известных как барорецепторная и гипоксическая вазоконстрикторная реакция, соответственно.

Помимо, структурных изменений, ЛАГ сопровождается повышением активности симпатического отдела ВНС. Барорецепторная реакция включает координированный симпатический контроль тонуса артерий большого круга, ЧСС и сократимости левого желудочка. В представленной работе внимание уделено влиянию ЛАГ на чувствительность сосудов большого круга к адренергическим воздействиям, а также адаптацию левого желудочка к системным эффектам ЛАГ.

В представленной работе впервые, установлено, что у животных с продолжительной, выраженной ЛАГ снижается способность артерий большого круга поддерживать тонус в ответ на активацию  $\alpha_1$ -адренорецепторов. Таким образом, в экспериментах *in vivo* подтверждено, что ремоделирование и изменение функционального состояния малого круга кровообращения приводит к перестройке регуляции сосудистого тонуса в большом круге кровообращения.

В работе впервые показано, что в условиях монокроталиновой модели, по меньшей мере у крыс, ЛАГ оказывает существенное влияние на барорецепторную регуляцию. Это влияние манифестирует в уменьшении диапазона и чувствительности БРР. ЛАГ ослабляет способность к рефлекторному увеличению ЧСС в ответ на снижение среднего артериального давления. Снижение чувствительности БРР происходит преимущественно за счет ослабления симпатического компонента рефлекторной реакции. Суть обнаруженного явления может определена, как феномен индуцированной тяжелой ЛАГ дисфункции барорецепторной регуляции ЧСС.

Результатом работы является выявление неоднотипности влияния ЛАГ на гипоксическую вазоконстрикторную реакцию в малом круге кровообращения:

продолжительная ЛАГ, по меньшей мере у крыс, может сопровождаться как сохранностью, так и приводить к выраженному подавлению ГВР.

В работе впервые выявлено, что ремоделирование русла малого круга кровообращения при ЛАГ приводит не только к хорошо известной и изученной правожелудочковой гипертрофии, но и вызывает функциональные изменения в левом желудочке. Продолжительная ЛАГ приводит к компенсаторному усилению сократимости, а также «интенсивности» расслабления левого желудочка, что обусловлено сниженным при ЛАГ объемом наполнения.

Помимо симпатического отдела ВНС, при ЛАГ существенно изменена активность РААС. Впервые установлено, что легочная артериальная гипертензия существенно искажает эффекты центрального элемента РААС - ангиотензина II как в большом, так и малом круге кровообращения. При развитии ЛАГ выявлено снижение ответов на прессорные стимулы в центральном сосудистом бассейне, по всей видимости обусловленное подавлением способности АТII к стимуляции перехода ГМК резистивных артерий СКК в сократительный фенотип. При использовании монокроталиновой модели ЛАГ влияние АТII на БРР оказывается снижено. В малом круге кровообращения при продолжительной ЛАГ наблюдается парадоксальная реакция восстановления ГВР в ответ на применение АТII.

Благодаря транскриптомному анализу в работе удалось сделать предположения о потенциальных механизмах, лежащих в основе наблюдаемых при ЛАГ феноменах в малом и большом кругах кровообращения. Сделано предположение, что индуцированное ЛАГ снижение способности к поддержанию тонуса сосудами СКК в ответ на прессорные стимулы обусловлено преимущественно уменьшением активности в цитоплазме ключевых регуляторов каскада MLCP – Rho и, в особенности, подавлением экспрессии белка-регулятора CPI-17. При ЛАГ наблюдается сниженная экспрессия  $\beta$ -адренорецепторов 1 и 2 типа, но повышается экспрессия  $\alpha$ 1-адренорецепторов. По всей видимости, именно снижение экспрессии  $\beta$ -адренорецепторов сердца играет ключевую роль в уменьшении рефлекторной тахикардии и диапазона барорефлекторной регуляции и формировании дисфункции барорецепторной регуляции ЧСС.

Установлено, что при экспериментальной монокроталиновой ЛАГ происходит повышение уровня экспрессии натрийуретических пептидов (ANP, CNP), а также их рецепторов, что, вероятно, снижает залповую активность симпатических преганглионаров, вызывает изменение транскриптомного профиля и ремоделирование симпатических постганглионаров, и, таким образом, уменьшает чувствительность барорецепторного рефлекса.

Установлено, что ЛАГ приводит к усилению экспрессии множества генов, продукты которых являются элементами системы кальциевого «круговорота» в кардиомиоцитах, но подавлена экспрессия гена фосфоламбана. При ЛАГ также увеличена экспрессия Ca<sup>2+</sup>-зависимых киназ. Увеличение амплитуды кальциевых транзитов в кардиомиоцитах, увеличение скорости удаления Ca<sup>2+</sup> из цитоплазмы, в сочетании с повышением экспрессии α1-АР способствуют росту индексов, характеризующих сократимость и параметры расслабления левожелудочкового миокарда.

Ослабление потенциации и инверсия влияния АТII на прессорные стимулы в большом круге кровообращения при ЛАГ, вероятно, обусловлены подавлением экспрессии и активности АТ1R, которое, в свою очередь, вызвано повышением уровня некоторых элементов тиреоидной регуляторной оси и накоплением натрийуретических пептидов. Слабое изменение ЧСС при действии АТII у животных с ЛАГ вероятно связано с исходно уменьшенным диапазоном БРР, а также, как указано выше, с ослаблением чувствительности к АТII за счет тиреоид-индуцированного подавления экспрессии АТ1R.

Следует отметить, что несмотря на длительную историю изучения вопроса, многие механизмы формирования ЛАГ, остаются нераскрытыми. Представленная работа, благодаря сочетанию транскриптомного (мРНК) секвенирования и ряда комплексных биоинформационных подходов, позволила сделать предположения о «глубинных» причинах ремоделирования стенки артерий малого круга и феноменов, сопровождающих ЛАГ. Установлено, что при ЛАГ происходит разнонаправленное изменение экспрессии множеств генов, вовлеченных в тиреоидную сигнализацию, включая гены рецепторов, транспортёров, дейодиназ и корегуляторов рецепторов тиреоидных гормонов. Полученные данные впервые позволили предположить, что развитие ЛАГ, сопровождается или обусловлено, феноменом дискоординации тиреоидной сигнализации в стенке артерий.

В работе подтверждено, что формирование монокроталиновой модели ЛАГ, как и развитие ЛАГ в клинике, сопровождается изменением экспрессии множества генов, связанных с иммунным ответом, развитием иммунного ответа, демонстрирует признаки инфильтрации стенки артерий иммунными клетками. В работе впервые показано, что активация аутоиммунных процессов в стенке артерий обусловлена сдвигами в транскриптомной машинерии, а именно активацией альтернативного сплайсинга и усилением изоформенного переключения, что приводит к усилению свойств и селекции онкоподобных клеток.

В итоге, в работе продемонстрирована множественность эффектов ЛАГ, приводящих к соответствующим адаптациям системной и легочной гемодинамики, установлены лежащие

в основе этого причины, а также ряд новых молекулярных механизмов, лежащих в основе ремоделирования стенки легочных артерий.

## VII. ВЫВОДЫ

1. Хроническая ЛАГ приводит к значимому снижению сердечного выброса при постоянной ЧСС; снижению ударного объема при неизменной фракции выброса левого желудочка. ЛАГ приводит к компенсаторному усилению зависимости сократимости левого желудочка (ЛЖ), а также «интенсивности» расслабления ЛЖ от конечно-диастолического объема.

2. Хроническая ЛАГ приводит уменьшению диапазона и чувствительности барорецепторной реакции. Ангиотензином II (АТII) при ЛАГ оказывает слабое влияние на барорецепторную реакцию.

3. При хронической ЛАГ снижается способность артерий большого круга поддерживать тонус в ответ на активацию адренорецепторов  $\alpha 1$ -типа. ЛАГ подавляет индуцированное АТII усиление сократительных способностей гладкомышечных клеток (ГМК) артерий большого круга кровообращения.

4. Вазоконстрикция в легочных артериях, индуцированная гипоксией (ГВР), при хронической ЛАГ приводит к значительному снижению сердечного выброса за счет уменьшения наполнения ЛЖ. В животной модели ЛАГ, индуцированной монокроталином, может наблюдаться подавление ГВР, восстановление которой вызывает АТII.

5. При ЛАГ, индуцированной монокроталином, происходит существенное изменение транскриптомного профиля миокарда, а также стенки легочных артерий; наблюдается изменение экспрессии генов, связанных с интенсивностью транскрипции и трансляции, контролем клеточного цикла, ответом на химический стресс, локальным иммунным и аутоиммунным ответом, функционированием вегетативных нервных окончаний, тиреоидной сигнализацией, регуляцией уровня цитоплазматического кальция в кардиомиоцитах, внутриклеточным контролем сократимости ГМК, передачей сигналов в каскадах адренорецепторов и ренин-ангиотензин-альдостероновой «оси».

6. При ЛАГ, индуцированной монокроталином, обнаруживаются существенное усиление альтернативного сплайсинга и изоформенного переключения, сопровождаемое накоплением транскриптов, продукты которых способствуют инфильтрации стенок сосудов иммунными клетками, стимуляции аутоиммунных реакций и селекции устойчивых к апоптозу клеток с опухолеподобными свойствами.

## VIII. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boron W. F., Boulpaep E. L. Medical Physiology, 2e Updated Edition E-Book: with STUDENT CONSULT Online Access. : Elsevier Health Sciences, 2012. 1351 с.
2. Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. : Springer International Publishing, 2016. 260 с.
3. Bretz F., Hothorn T., Westfall P. Multiple Comparisons Using R. : CRC Press, 2016. 202 с.
4. Zuur A. и др. Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R. : Springer Science & Business Media, 2009. 579 с.
5. Boron W. F., Boulpaep E. L. Medical Physiology. : Elsevier, 2017. 1297 с.
6. Pinheiro J. C., Bates D. Mixed-Effects Models in S and S-PLUS. : Springer Science & Business Media, 2009. 538 с.
7. Gomez-Arroyo J. G. и др. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective // American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology. 2012. Т. 302. № 4. С. L363–L369.
8. Абрамов А. А. и др. ЛЕГОЧНАЯ АРТЕРИАЛЬНАЯ ГИПЕРТЕНЗИЯ ОСЛАБЛЯЕТ ВАЗОКОНСТРИКТОРНЫЕ РЕАКЦИИ, ВЫЗВАННЫЕ АКТИВАЦИЕЙ АЛЬФА-1-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В БОЛЬШОМ КРУГЕ КРОВООБРАЩЕНИЯ // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2023. Т. 109. № 10. С. 1498–1514.
9. Капелько В. И. и др. Компенсаторные изменения диастолы при уменьшении притока к сердцу // Бюллетень Экспериментальной Биологии И Медицины. 2021. Т. 171. № 1.
10. Лакомкин В. Л. и др. Нормализация насосной функции диабетического сердца при снижении функциональной нагрузки // Кардиология. 2022. Т. 62. № 3. С. 34–39.
11. Селиванова Е. К., Тарасова О. С. Nongenomic Effects of Thyroid Hormones: Their Role in Regulation of the Vascular System // Moscow University Biological Sciences Bulletin. 2020. Т. 75. № 4. С. 189–198.
12. Тарасова О. С., Гайнуллина Д. К. Rho-Киназа Как Ключевой Участник Регуляции Тонуса Сосудов В Норме И При Сосудистых Расстройствах // Артериальная Гипертензия. 2017. Т. 23. № 5. С. 383–394.
13. Abraham D. M. и др.  $\beta$ -Arrestin mediates the Frank–Starling mechanism of cardiac contractility // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2016. Т. 113. № 50. С. 14426.
14. Ahmadi Z. и др. An Overlook to the Characteristics and Roles Played by Eotaxin Network in the Pathophysiology of Food Allergies: Allergic Asthma and Atopic Dermatitis // Inflammation. 2016. Т. 39. № 3. С. 1253–1267.
15. Ahmarani L. и др. Whole-cell and nuclear NADPH oxidases levels and distribution in human endocardial endothelial, vascular smooth muscle, and vascular endothelial cells // Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 2013. Т. 91. № 1. С. 71–79.
16. Alfonso-Gonzalez C., Hilgers V. (Alternative) transcription start sites as regulators of RNA processing // Trends in Cell Biology. 2024. Т. 34. № 12. С. 1018–1028.
17. Allen S. E. и др. Cell-Specific RNA Binding Protein Rbfox2 Regulates CaV2.2 mRNA Exon Composition and CaV2.2 Current Size // eNeuro. 2017. Т. 4. № 5. С. ENEURO.0332-16.2017.

18. Al-Mathkour M. M. и др. The Hippo effector YAP1/TEAD1 regulates EPHA3 expression to control cell contact and motility // *Sci Rep*. 2022. Т. 12. С. 3840.
19. Ambasta R. K. и др. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase // *J. Biol. Chem.* 2004. Т. 279. № 44. С. 45935–45941.
20. Ames M. K., Atkins C. E., Pitt B. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression // *J Vet Intern Med.* 2019. Т. 33. № 2. С. 363–382.
21. An H. и др. dr4pl: A Stable Convergence Algorithm for the 4 Parameter Logistic Model // *The R Journal*. 2019. Т. 11. № 2. С. 171–190.
22. Anilkumar Narayana и др. A 28-kDa Splice Variant of NADPH Oxidase-4 Is Nuclear-Localized and Involved in Redox Signaling in Vascular Cells // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2013. Т. 33. № 4. С. e104–e112.
23. Arel-Bundock V., Greifer N., Heiss A. How to Interpret Statistical Models Using marginaleffects for R and Python // *Journal of Statistical Software*. 2024. Т. 111. № 9. С. 1–32.
24. Artavanis-Tsakonas S., Rand M. D., Lake R. J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development // *Science*. 1999. Т. 284. № 5415. С. 770–776.
25. Aschrafi A. и др. Angiotensin II Mediates the Axonal Trafficking of Tyrosine Hydroxylase and Dopamine  $\beta$ -Hydroxylase mRNAs and enhances Norepinephrine Synthesis in Primary Sympathetic Neurons // *J Neurochem*. 2019. Т. 150. № 6. С. 666–677.
26. Ashburner M. и др. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium // *Nat Genet*. 2000. Т. 25. № 1. С. 25–29.
27. Atkinson C. и др. Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor // *Circulation*. 2002. Т. 105. № 14. С. 1672–1678.
28. Barnes P. J., Liu S. F. Regulation of pulmonary vascular tone // *Pharmacol. Rev.* 1995. Т. 47. № 1. С. 87–131.
29. Barnes W. G. и др.  $\beta$ -Arrestin 1 and G $\alpha$ q/11 Coordinately Activate RhoA and Stress Fiber Formation following Receptor Stimulation // *J. Biol. Chem.* 2005. Т. 280. № 9. С. 8041–8050.
30. Barrett L. W., Fletcher S., Wilton S. D. Untranslated Gene Regions and Other Non-coding Elements // *Untranslated Gene Regions and Other Non-coding Elements: Regulation of Eukaryotic Gene Expression* / под ред. L. W. Barrett, S. Fletcher, S. D. Wilton. Basel: Springer, 2013. С. 1–56.
31. Barst R. J. и др. Evidence for the association of unexplained pulmonary hypertension in children with the major histocompatibility complex // *Circulation*. 1992. Т. 85. № 1. С. 249–258.
32. Bates D. и др. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4 // *Journal of Statistical Software*. 2015. Т. 67. № 1. С. 1–48.
33. Batton K. A. и др. Sex differences in pulmonary arterial hypertension: role of infection and autoimmunity in the pathogenesis of disease // *Biol Sex Differ*. 2018. Т. 9. № 1. С. 15.
34. Bedaiwi S., Usmani A., Carty M. P. Canonical and Non-Canonical Roles of Human DNA Polymerase  $\eta$  // *Genes (Basel)*. 2024. Т. 15. № 10. С. 1271.

35. Benigni A., Cassis P., Remuzzi G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging // *EMBO Mol Med*. 2010. Т. 2. № 7. С. 247–257.
36. Bensaad K. и др. TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis // *Cell*. 2006. Т. 126. № 1. С. 107–120.
37. Bhuva D. D. *vissE: Visualising Set Enrichment Analysis Results.* , 2024.
38. Bianco A. C., Kim B. W. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action // *J Clin Invest*. 2006. Т. 116. № 10. С. 2571–2579.
39. Birkenfeld A. L. и др. Beta-adrenergic and atrial natriuretic peptide interactions on human cardiovascular and metabolic regulation // *J Clin Endocrinol Metab*. 2006. Т. 91. № 12. С. 5069–5075.
40. Bkaily G. и др. Angiotensin II AT1 receptor internalization, translocation and de novo synthesis modulate cytosolic and nuclear calcium in human vascular smooth muscle cells // *Can J Physiol Pharmacol*. 2003. Т. 81. № 3. С. 274–287.
41. Bocharov E. V. и др. Left-handed dimer of EphA2 transmembrane domain: Helix packing diversity among receptor tyrosine kinases // *Biophys J*. 2010. Т. 98. № 5. С. 881–889.
42. Boekel J. и др. Multi-omic data analysis using Galaxy // *Nat Biotechnol*. 2015. Т. 33. № 2. С. 137–139.
43. Boyer M. J. и др. Endothelial cell-derived extracellular vesicles alter vascular smooth muscle cell phenotype through high-mobility group box proteins // *J Extracell Vesicles*. Т. 9. № 1. С. 1781427.
44. Brent G. A. Mechanisms of thyroid hormone action // *J Clin Invest*. 2012. Т. 122. № 9. С. 3035–3043.
45. Brescia P. и др. MEF2B instructs germinal center development and acts as an oncogene in B cell lymphomagenesis // *Cancer Cell*. 2018. Т. 34. № 3. С. 453- 465.e9.
46. Brown N. K. и др. Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014. Т. 34. № 8. С. 1621–1630.
47. Bueno-Beti C. и др. Pulmonary Artery Hypertension Model in Rats by Monocrotaline Administration // *Methods Mol Biol*. 2018. Т. 1816. С. 233–241.
48. Burger K. и др. Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels // *J Biol Chem*. 2010. Т. 285. № 16. С. 12416–12425.
49. Bylund D. B. и др. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors // *Pharmacol. Rev*. 1994. Т. 46. № 2. С. 121–136.
50. Cameron A., Brand T. van den. *geomtextpath: Use Curved Text in Ggplot2.* , 2022.
51. Carlson M. *GO.db: A set of annotation maps describing the entire Gene Ontology.* , 2024a.
52. Carlson M. *org.Rn.eg.db: Genome wide annotation for Rat.* , 2024b.
53. Carman B. L. и др. Plexiform Arteriopathy in Rodent Models of Pulmonary Arterial Hypertension // *Am J Pathol*. 2019. Т. 189. № 6. С. 1133–1144.
54. Chai S. Y. и др. The angiotensin IV/AT4 receptor // *Cell. Mol. Life Sci*. 2004. Т. 61. № 21. С. 2728–2737.

55. Chang L. и др. Bmal1 in perivascular adipose tissue regulates resting phase blood pressure through transcriptional regulation of angiotensinogen // *Circulation*. 2018. Т. 138. № 1. С. 67–79.
56. Chen C. и др. Cytosolic CARP Promotes Angiotensin II- or Pressure Overload-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy through Calcineurin Accumulation // *PLoS One*. 2014. Т. 9. № 8. С. e104040.
57. Chen J. и др. Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Promotes Pulmonary Vascular Remodeling and is a Therapeutic Target in Pulmonary Arterial Hypertension // *Circulation*. 2017. Т. 135. № 16. С. 1532–1546.
58. Chen S.-L. и др. Hemodynamic, Functional, and Clinical Responses to Pulmonary Artery Denervation in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension of Different Causes // *Circ Cardiovasc Interv*. 2015. Т. 8. № 11.
59. Chen T. и др. Breathing new insights into the role of mutant p53 in lung cancer // *Oncogene*. 2025. Т. 44. № 3. С. 115–129.
60. Chen X. и др. A membrane-associated MHC-I inhibitory axis for cancer immune evasion // *Cell*. 2023. Т. 186. № 18. С. 3903–3920.e21.
61. Chen X. и др. Bibliometric analysis of T-cells immunity in pulmonary hypertension from 1992 to 2022 // *Immun Inflamm Dis*. 2024. Т. 12. № 7. С. e1280.
62. Cheung E. C., Ludwig R. L., Vousden K. H. Mitochondrial localization of TIGAR under hypoxia stimulates HK2 and lowers ROS and cell death // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012. Т. 109. № 50. С. 20491–20496.
63. Christ-Crain M. и др. Pro-A-type and N-terminal pro-B-type natriuretic peptides in different thyroid function states // *Swiss Med Wkly*. 2005. Т. 135. № 37–38. С. 549–554.
64. Connolly A. и др. Interplay between intracellular loop 1 and helix VIII of the angiotensin II type 2 receptor controls its activation // *Biochem Pharmacol*. 2019. Т. 168. С. 330–338.
65. Corboz M. R. и др. Current Overview of the Biology and Pharmacology in Sugen/Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension in Rats // *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2024. Т. 37. № 5. С. 241–283.
66. Costamagna M. E. и др. Atrial natriuretic peptide inhibits iodide uptake and thyroglobulin messenger ribonucleic acid expression in cultured bovine thyroid follicles // *Regul Pept*. 2002. Т. 106. № 1–3. С. 19–26.
67. Daftuar L. и др. Ribosomal proteins RPL37, RPS15 and RPS20 regulate the Mdm2-p53-MdmX network // *PLoS One*. 2013. Т. 8. № 7. С. e68667.
68. Dai Y. и др. Neuropeptide FF Promotes Recovery of Corneal Nerve Injury Associated With Hyperglycemia // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015. Т. 56. № 13. С. 7754–7765.
69. Dam S. H., Olsen L. R., Vitting-Seerup K. Expression and splicing mediate distinct biological signals // *BMC Biology*. 2023. Т. 21. № 1. С. 220.
70. Davies R. J., Morrell N. W. Molecular mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of mutations in the bone morphogenetic protein type II receptor // *Chest*. 2008. Т. 134. № 6. С. 1271–1277.
71. Davis P. J., Davis F. B., Mousa S. A. Thyroid hormone-induced angiogenesis // *Curr Cardiol Rev*. 2009. Т. 5. № 1. С. 12–16.

72. Davis P. J., Goglia F., Leonard J. L. Nongenomic actions of thyroid hormone // *Nat Rev Endocrinol*. 2016. Т. 12. № 2. С. 111–121.
73. De Mello W. C., Danser A. H. Angiotensin II and the heart : on the intracrine renin-angiotensin system // *Hypertension*. 2000. Т. 35. № 6. С. 1183–1188.
74. Deuss F. A. и др. Recognition of nectin-2 by the natural killer cell receptor T cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT) // *J Biol Chem*. 2017. Т. 292. № 27. С. 11413–11422.
75. Devilard E. и др. Nectin-3 (CD113) interacts with Nectin-2 (CD112) to promote lymphocyte transendothelial migration // *PLoS One*. 2013. Т. 8. № 10. С. e77424.
76. DeWire S. M. и др. Beta-arrestins and cell signaling // *Annu Rev Physiol*. 2007. Т. 69. С. 483–510.
77. Dimopoulos G. J. и др. Ca<sup>2+</sup>-dependent rapid Ca<sup>2+</sup> sensitization of contraction in arterial smooth muscle // *Circ Res*. 2007. Т. 100. № 1. С. 121–129.
78. Ding L. и др. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma // *Nature*. 2008. Т. 455. № 7216. С. 1069–1075.
79. Domenga V. и др. Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells // *Genes Dev*. 2004. Т. 18. № 22. С. 2730–2735.
80. Dumitrascu R. и др. Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury // *BMC Pulm Med*. 2008. Т. 8. С. 25.
81. Dunham-Snary K. J. и др. Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction // *Chest*. 2017. Т. 151. № 1. С. 181–192.
82. Dunham-Snary K. J. и др. Ndufs2, A Core Subunit of Mitochondrial Complex I, Is Essential for Acute Oxygen-Sensing and Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction // *Circ Res*. 2019. Т. 124. № 12. С. 1727–1746.
83. El-Benna J. и др. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases // *Exp. Mol. Med*. 2009. Т. 41. № 4. С. 217–225.
84. Elfman J., Pham L.-P., Li H. The Relationship Between Chimeric RNAs and Gene Fusions; Potential Implications of Reciprocity in Cancer // *J Genet Genomics*. 2020. Т. 47. № 7. С. 341–348.
85. Elia L. и др. UHRF1 epigenetically orchestrates smooth muscle cell plasticity in arterial disease // *J Clin Invest*. 2018. Т. 128. № 6. С. 2473–2486.
86. Escobales N., Nuñez R. E., Javadov S. Mitochondrial angiotensin receptors and cardioprotective pathways // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2019. Т. 316. № 6. С. H1426–H1438.
87. Esteban V. и др. Regulator of calcineurin 1 mediates pathological vascular wall remodeling // *J Exp Med*. 2011. Т. 208. № 10. С. 2125–2139.
88. Eto M. и др. Nuclear localization of CPI-17, a protein phosphatase-1 inhibitor protein, affects histone H3 phosphorylation and corresponds to proliferation of cancer and smooth muscle cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013. Т. 434. № 1. С. 137–142.
89. Fabre S. и др. Prominent Role of the Ig-like V Domain intrans-Interactions of Nectins: NECTIN3 AND NECTIN4 BIND TO THE PREDICTED C-C'-C''-D β-STRANDS OF THE NECTIN1 V DOMAIN \* // *Journal of Biological Chemistry*. 2002. Т. 277. № 30. С. 27006–27013.

90. Faili A. и др. A backup role of DNA polymerase kappa in Ig gene hypermutation only takes place in the complete absence of DNA polymerase eta // *J Immunol*. 2009. Т. 182. № 10. С. 6353–6359.
91. Fang Y.-H. и др. Therapeutic inhibition of fatty acid oxidation in right ventricular hypertrophy: exploiting Randle's cycle // *J. Mol. Med.* 2012. Т. 90. № 1. С. 31–43.
92. Farber H. W., Loscalzo J. Pulmonary Arterial Hypertension // *New England Journal of Medicine*. 2004. Т. 351. № 16. С. 1655–1665.
93. Fischer H. Mechanisms and Function of DUOX in Epithelia of the Lung // *Antioxid Redox Signal*. 2009. Т. 11. № 10. С. 2453–2465.
94. Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes // *Oncogene*. 2017. Т. 36. № 28. С. 3943–3956.
95. Fisher E., Feng J. RNA splicing regulators play critical roles in neurogenesis // *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2022. Т. 13. № 6. С. e1728.
96. Flynn R. A. и др. Small RNAs are modified with N-glycans and displayed on the surface of living cells // *Cell*. 2021. Т. 184. № 12. С. 3109–3124.e22.
97. Foderaro A., Ventetuolo C. E. Pulmonary Arterial Hypertension and the Sex Hormone Paradox // *Curr. Hypertens. Rep.* 2016. Т. 18. № 11. С. 84.
98. Forrester S. J. и др. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology // *Physiol Rev*. 2018. Т. 98. № 3. С. 1627–1738.
99. Forse G. J. и др. Distinctive Structure of the EphA3/Ephrin-A5 Complex Reveals a Dual Mode of Eph Receptor Interaction for Ephrin-A5 // *PLoS One*. 2015. Т. 10. № 5. С. e0127081.
100. Fox J., Weisberg S. *An R Companion to Applied Regression*. Los Angeles: SAGE Publications, Inc, 2019. 608 с.
101. Frazziano G. и др. Nox-derived ROS are acutely activated in pressure overload pulmonary hypertension: indications for a seminal role for mitochondrial Nox4 // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2013. Т. 306. № 2. С. H197–H205.
102. Furlanis E., Scheiffele P. Regulation of neuronal differentiation, function, and plasticity by alternative splicing // *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2018. Т. 34. С. 451–469.
103. Fyhrquist F., Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited // *J Intern Med*. 2008. Т. 264. № 3. С. 224–236.
104. Galaxy Community. The Galaxy platform for accessible, reproducible, and collaborative data analyses: 2024 update // *Nucleic Acids Res*. 2024. Т. 52. № W1. С. W83–W94.
105. Gao D. и др. Regulation of angiotensin II-Induced Krüppel-like factor 5 expression in vascular smooth muscle cells // *Biol Pharm Bull*. 2006. Т. 29. № 10. С. 2004–2008.
106. Gasparo M. de и др. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors // *Pharmacological Reviews*. 2000. Т. 52. № 3. С. 415–472.
107. Ge S. X., Jung D., Yao R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants // *Bioinformatics*. 2020. Т. 36. № 8. С. 2628–2629.

108. Gene Ontology Consortium и др. The Gene Ontology knowledgebase in 2023 // *Genetics*. 2023. Т. 224. № 1. С. iyad031.
109. Ghosh S. и др. Activation Dynamics and Signaling Properties of Notch3 Receptor in the Developing Pulmonary Artery // *J Biol Chem*. 2011. Т. 286. № 25. С. 22678–22687.
110. Ghoulch I. A. и др. Endothelial Nox1 oxidase assembly in human pulmonary arterial hypertension; driver of Gremlin1-mediated proliferation // *Clin. Sci*. 2017. Т. 131. № 15. С. 2019–2035.
111. Glinos D. A. и др. Transcriptome variation in human tissues revealed by long-read sequencing // *Nature*. 2022. Т. 608. № 7922. С. 353–359.
112. Glock C. и др. The translatoome of neuronal cell bodies, dendrites, and axons // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021. Т. 118. № 43. С. e2113929118.
113. Godet A.-C. и др. IRES Trans-Acting Factors, Key Actors of the Stress Response // *Int J Mol Sci*. 2019. Т. 20. № 4. С. 924.
114. Gold J. I. и др. Nuclear Translocation of Cardiac G Protein-Coupled Receptor Kinase 5 Downstream of Select Gq-Activating Hypertrophic Ligands Is a Calmodulin-Dependent Process // *PLoS One*. 2013. Т. 8. № 3. С. e57324.
115. Goldfarb T. и др. NCBI RefSeq: reference sequence standards through 25 years of curation and annotation // *Nucleic Acids Res*. 2025. Т. 53. № D1. С. D243–D257.
116. Gondou A. и др. Induction of type 2 deiodinase activity by cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in cultured rat glial cells // *Thyroid*. 1998. Т. 8. № 7. С. 615–622.
117. Gour N. и др. A GPCR-neuropeptide axis dampens hyperactive neutrophils by promoting an alternative-like polarization during bacterial infection // *Immunity*. 2024. Т. 57. № 2. С. 333- 348.e6.
118. Grandi N., Tramontano E. HERV Envelope Proteins: Physiological Role and Pathogenic Potential in Cancer and Autoimmunity // *Front. Microbiol*. 2018. Т. 9.
119. Grasberger H., Refetoff S. Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent // *The Journal of Biological Chemistry*. 2006. Т. 281. № 27. С. 18269–18272.
120. Grigoras A. и др. Perivascular adipose tissue in cardiovascular diseases-an update // *Anatol J Cardiol*. 2019. Т. 22. № 5. С. 219–231.
121. Groeneveldt J. A., Man F. S. de, Westerhof B. E. The right treatment for the right ventricle // *Curr Opin Pulm Med*. 2019. Т. 25. № 5. С. 410–417.
122. Guignabert C. и др. Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats // *Circulation*. 2005. Т. 111. № 21. С. 2812–2819.
123. Gust R., Schuster D. P. Vascular remodeling in experimentally induced subacute canine pulmonary hypertension // *Exp Lung Res*. 2001. Т. 27. № 1. С. 1–12.
124. Haas B. J. и др. STAR-Fusion: Fast and Accurate Fusion Transcript Detection from RNA-Seq // 2017. С. 120295.
125. Hadziefendic S., Haxhiu M. A. CNS innervation of vagal preganglionic neurons controlling peripheral airways: a transneuronal labeling study using pseudorabies virus // *J. Auton. Nerv. Syst*. 1999. Т. 76. № 2–3. С. 135–145.

126. Halekoh U., Højsgaard S. A Kenward-Roger Approximation and Parametric Bootstrap Methods for Tests in Linear Mixed Models – The R Package pbkrtest // *Journal of Statistical Software*. 2014. Т. 59. № 9. С. 1–30.
127. Hallgren J. и др. DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks // 2022. С. 2022.04.08.487609.
128. Harijith A., Natarajan V., Fu P. The Role of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases in Lung Architecture Remodeling // *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2017. Т. 6. № 4.
129. Harris H. E., Andersson U., Pisetsky D. S. HMGB1: A multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease // *Nat Rev Rheumatol*. 2012. Т. 8. № 4. С. 195–202.
130. Hassoun P. M. и др. Endothelin 1: mitogenic activity on pulmonary artery smooth muscle cells and release from hypoxic endothelial cells // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1992. Т. 199. № 2. С. 165–170.
131. Head G. A., McCarty R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats // *J. Auton. Nerv. Syst*. 1987. Т. 21. № 2–3. С. 203–213.
132. Head G. A., Saigusa T., Mayorov D. N. Angiotensin and baroreflex control of the circulation // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2002. Т. 35. № 9. С. 1047–1059.
133. Hecker L. и др. NADPH Oxidase-4 Mediates Myofibroblast Activation and Fibrogenic Responses to Lung Injury // *Nat Med*. 2009. Т. 15. № 9. С. 1077–1081.
134. Hemnes A. R., Brittain E. L. Autonomic Nervous System in Pulmonary Arterial Hypertension: Time to Rest and Digest // *Circulation*. 2018. Т. 137. № 9. С. 925–927.
135. Hiepen C., Mendez P.-L., Knaus P. It Takes Two to Tango: Endothelial TGF $\beta$ /BMP Signaling Crosstalk with Mechanobiology // *Cells*. 2020. Т. 9. № 9. С. 1965.
136. Hilenski L. L. и др. Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2004. Т. 24. № 4. С. 677–683.
137. Holt C. E., Martin K. C., Schuman E. M. Local translation in neurons: visualization and function // *Nat Struct Mol Biol*. 2019. Т. 26. № 7. С. 557–566.
138. Hu W. и др. Renal sympathetic denervation prevents the development of pulmonary arterial hypertension and cardiac dysfunction in dogs // *Kaohsiung J. Med. Sci*. 2015. Т. 31. № 8. С. 405–412.
139. Huang Y. и др. Transthoracic Pulmonary Artery Denervation for Pulmonary Arterial Hypertension // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2019.
140. Huetsch J. C., Suresh K., Shimoda L. A. Regulation of Smooth Muscle Cell Proliferation by NADPH Oxidases in Pulmonary Hypertension // *Antioxidants (Basel)*. 2019. Т. 8. № 3. С. 56.
141. Hughes J. F., Coffin J. M. Evidence for genomic rearrangements mediated by human endogenous retroviruses during primate evolution // *Nat Genet*. 2001. Т. 29. № 4. С. 487–489.
142. Humbert M. и др. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension // *J Am Coll Cardiol*. 2004. Т. 43. № 12 Suppl S. С. 13S–24S.
143. Hunyady L., Catt K. J. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II // *Mol. Endocrinol*. 2006. Т. 20. № 5. С. 953–970.

144. Hurley A. datacleanr: Interactive and Reproducible Data Cleaning. , 2025.
145. Hussein A. A. и др. Thyroid hormone is highly permissive in angioproliferative pulmonary hypertension in rats // *European Respiratory Journal*. 2012. Т. 41. № 1. С. 104–114.
146. Ichiki T. Thyroid Hormone and Vascular Remodeling // *J Atheroscler Thromb*. 2016. Т. 23. № 3. С. 266–275.
147. Imai T. и др. Hormonal regulation of rat adrenomedullin gene in vasculature // *Endocrinology*. 1995. Т. 136. № 4. С. 1544–1548.
148. Inuzuka T. и др. Attenuation of ligand-induced activation of angiotensin II type 1 receptor signaling by the type 2 receptor via protein kinase C // *Sci Rep*. 2016. Т. 6.
149. Ishak Gabra N. B. и др. Pulmonary Arterial Hypertension and Therapeutic Interventions // *Int J Angiol*. 2019. Т. 28. № 2. С. 80–92.
150. Ishikawa M. и др. Effects of a pure alpha/beta-adrenergic receptor blocker on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension with right ventricular hypertrophy in rats // *Circ. J*. 2009. Т. 73. № 12. С. 2337–2341.
151. Isumi Y. и др. Regulation of adrenomedullin production in rat endothelial cells // *Endocrinology*. 1998. Т. 139. № 3. С. 838–846.
152. Jha J. C. и др. The emerging role of NADPH oxidase NOX5 in vascular disease // *Clinical Science (London, England: 1979)*. 2017. Т. 131. № 10. С. 981–990.
153. Jiao X. и др. Vascular smooth muscle cells specific deletion of angiotensin-like protein 8 prevents angiotensin II-promoted hypertension and cardiovascular hypertrophy // *Cardiovasc Res*. 2023. Т. 119. № 9. С. 1856–1868.
154. Jin A. и др. High Expression of THBS1 Leads to a Poor Prognosis in Papillary Thyroid Cancer and Suppresses the Anti-Tumor Immune Microenvironment // *Technol Cancer Res Treat*. 2022. Т. 21. С. 15330338221085360.
155. Jones R. D., Thompson J. S., Morice A. H. The NADPH oxidase inhibitors iodonium diphenyl and cadmium sulphate inhibit hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated rat pulmonary arteries // *Physiol Res*. 2000. Т. 49. № 5. С. 587–596.
156. Jones R. J. и др. Autoimmunity Is a Significant Feature of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension // *Am J Respir Crit Care Med*. Т. 206. № 1. С. 81–93.
157. Jong T. V. de и др. A revamped rat reference genome improves the discovery of genetic diversity in laboratory rats // *Cell Genom*. 2024. Т. 4. № 4. С. 100527.
158. Jong Y. I., Harmon S. K., O'Malley K. L. GPCR signalling from within the cell // *Br J Pharmacol*. 2018a. Т. 175. № 21. С. 4026–4035.
159. Jong Y.-J. I., Harmon S. K., O'Malley K. L. Intracellular GPCRs play key roles in synaptic plasticity // *ACS Chem Neurosci*. 2018b. Т. 9. № 9. С. 2162–2172.
160. Juaiti M. и др. Integrated bioinformatics analysis and experimental animal models identify a robust biomarker and its correlation with the immune microenvironment in pulmonary arterial hypertension // *Heliyon*. 2024. Т. 10. № 8. С. e29587.

161. K Bhosle V. и др. Nuclear localization of platelet-activating factor receptor controls retinal neovascularization // *Cell Discov.* 2016. Т. 2. С. 16017.
162. Kabashima K. и др. Biomarkers for evaluation of mast cell and basophil activation // *Immunol Rev.* 2018. Т. 282. № 1. С. 114–120.
163. Kanehisa M. и др. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes // *Nucleic Acids Res.* 2023. Т. 51. № D1. С. D587–D592.
164. Kanehisa M., Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes // *Nucleic Acids Res.* 2000. Т. 28. № 1. С. 27–30.
165. Kang Y.-J. и др. CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features // *Nucleic Acids Res.* 2017. Т. 45. № W1. С. W12–W16.
166. Kassambara A. rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests // 2020.
167. Kassambara A. ggpubr: «ggplot2» Based Publication Ready Plots. , 2025.
168. Kato K., Hecker L. NADPH oxidases: Pathophysiology and therapeutic potential in age-associated pulmonary fibrosis // *Redox Biol.* 2020. Т. 33.
169. Katta S. S., Smoyer C. J., Jaspersen S. L. Destination: inner nuclear membrane // *Trends Cell Biol.* 2014. Т. 24. № 4. С. 221–229.
170. Katz A. M. The “Modern” View of Heart Failure How Did We Get Here? // *Circ Heart Fail.* 2008. Т. 1. № 1. С. 63–71.
171. Katz A. M. A Modern View of Heart Failure: Practical Applications of Cardiovascular Physiology // *Comprehensive Physiology* / под ред. R. Terjung. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011. С. cp020121.
172. Kay J. M. и др. Fulvine and the pulmonary circulation // *Thorax.* 1971. Т. 26. № 3. С. 249–261.
173. Kay M. ggdist: Visualizations of Distributions and Uncertainty in the Grammar of Graphics // *IEEE Transactions on Visualization and Computer Graphics.* 2024. Т. 30. № 1. С. 414–424.
174. Kim J. I. и др. Expression of CPI-17 in smooth muscle during embryonic development and in neointimal lesion formation // *Histochem Cell Biol.* 2009. Т. 132. № 2. С. 191–198.
175. Kim J. I. и др. Reciprocal regulation controlling the expression of CPI-17, a specific inhibitor protein for the myosin light chain phosphatase in vascular smooth muscle cells // *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2012. Т. 303. № 1. С. C58–C68.
176. Kimura K. и др. Diversification of transcriptional modulation: Large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes // *Genome Res.* 2006. Т. 16. № 1. С. 55–65.
177. Kishimoto I. и др. Natriuretic peptide system: an overview of studies using genetically engineered animal models // *FEBS J.* 2011. Т. 278. № 11. С. 1830–1841.
178. Klein I., Danzi S. Thyroid disease and the heart // *Circulation.* 2007. Т. 116. № 15. С. 1725–1735.
179. Knight D. S. и др. A light and electron microscopic study of the innervation of pulmonary arteries in the cat // *Anat. Rec.* 1981. Т. 201. № 3. С. 513–521.

180. Knock G. A. NADPH oxidase in the vasculature: Expression, regulation and signalling pathways; role in normal cardiovascular physiology and its dysregulation in hypertension // *Free Radical Biology and Medicine*. 2019. Т. 145. С. 385–427.
181. Konwar S. и др. Thrombospondin-1 inhibits alternative complement pathway activation in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis // *J Clin Invest*. Т. 135. № 13. С. e180062.
182. Kopan R., Ilagan M. X. G. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism // *Cell*. 2009. Т. 137. № 2. С. 216–233.
183. Korotkevich G. и др. Fast gene set enrichment analysis // 2021. С. 060012.
184. Kummer W. Pulmonary vascular innervation and its role in responses to hypoxia: size matters! // *Proc Am Thorac Soc*. 2011. Т. 8. № 6. С. 471–476.
185. Labandeira-Garcia J. L. и др. The intracellular renin-angiotensin system: Friend or foe. Some light from the dopaminergic neurons // *Prog Neurobiol*. 2020.
186. Lai Y. и др. TIGIT deficiency promotes autoreactive CD4+ T-cell responses through a metabolic–epigenetic mechanism in autoimmune myositis // *Nat Commun*. 2025. Т. 16. № 1. С. 4502.
187. Lambeth J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen // *Nat. Rev. Immunol*. 2004. Т. 4. № 3. С. 181–189.
188. Lan N. S. H. и др. Pulmonary Arterial Hypertension: Pathophysiology and Treatment // *Diseases*. 2018. Т. 6. № 2.
189. Landis J. ggside: Side Grammar Graphics. , 2025.
190. Lassègue B., Clempus R. E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 2003. Т. 285. № 2. С. R277–297.
191. Lavery D. N., Mcewan I. J. Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations // *Biochem J*. 2005. Т. 391. № Pt 3. С. 449–464.
192. Lenth R. V. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means // 2024.
193. Li H. и др. Regulator of G protein signaling 5 protects against cardiac hypertrophy and fibrosis during biomechanical stress of pressure overload // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. Т. 107. № 31. С. 13818–13823.
194. Li M. The role of P53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) in ovarian development, cardiovascular and neurodegenerative diseases // *Apoptosis*. 2021. Т. 26. № 5–6. С. 235–247.
195. Li X. и др. Notch3 signaling promotes the development of pulmonary arterial hypertension // *Nat Med*. 2009. Т. 15. № 11. С. 1289–1297.
196. Li X. и др. KLF5 mediates vascular remodeling via HIF-1 $\alpha$  in hypoxic pulmonary hypertension // *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2015. Т. 310. № 4. С. L299–L310.
197. Li Y. и др. Spliceosome-regulated RSRP1-dependent NF- $\kappa$ B activation promotes the glioblastoma mesenchymal phenotype // *Neuro Oncol*. 2021. Т. 23. № 10. С. 1693–1708.
198. Li Y. и др. GlycoRNA-L and glycoRNA-S mediate human monocyte adhesion via binding to Siglec-5 // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2025. Т. 1872. № 7. С. 120017.

199. Li Z., Qin F., Li H. Chimeric RNAs and Their Implications in Cancer // *Curr Opin Genet Dev.* 2018. Т. 48. С. 36–43.
200. Lim W.-W. и др. Interleukin-11 is important for vascular smooth muscle phenotypic switching and aortic inflammation, fibrosis and remodeling in mouse models // *Sci Rep.* 2020. Т. 10.
201. Liu C.-H. и др. Arrestin-biased AT1R agonism induces acute catecholamine secretion through TRPC3 coupling // *Nat Commun.* 2017a. Т. 8.
202. Liu J. Q. и др. Hypoxic constriction and reactive oxygen species in porcine distal pulmonary arteries // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2003. Т. 285. № 2. С. L322-333.
203. Liu Q. и др. Effects of renal denervation on monocrotaline induced pulmonary remodeling // *Oncotarget.* 2017b. Т. 8. № 29. С. 46846–46855.
204. Liu X. и др. Blocking mitochondrial cyclophilin D ameliorates TSH-impaired defensive barrier of artery // *Redox Biology.* 2018. Т. 15. С. 418–434.
205. Liu Y. и др. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes promote murine skin wound healing by neutrophil and macrophage modulations revealed by single-cell RNA sequencing // *Front Immunol.* 2023. Т. 14. С. 1142088.
206. Llanos S., Serrano M. Depletion of ribosomal protein L37 occurs in response to DNA damage and activates p53 through the L11/MDM2 pathway // *Cell Cycle.* 2010. Т. 9. № 19. С. 4005–4012.
207. Lu G. и др. RGS5 as a Biomarker of Pericytes, Involvement in Vascular Remodeling and Pulmonary Arterial Hypertension // *Vasc Health Risk Manag.* 2023. Т. 19. С. 673–688.
208. Luchner A., Schunkert H. Interactions between the sympathetic nervous system and the cardiac natriuretic peptide system // *Cardiovasc Res.* 2004. Т. 63. № 3. С. 443–449.
209. Lüdecke D. и др. see: An R Package for Visualizing Statistical Models // *Journal of Open Source Software.* 2021. Т. 6. № 64. С. 3393.
210. Luo W., Brouwer C. Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization // *Bioinformatics.* 2013. Т. 29. № 14. С. 1830–1831.
211. Lyle A. N. и др. Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells // *Circ. Res.* 2009. Т. 105. № 3. С. 249–259.
212. Lympereopoulos A. и др. An adrenal  $\beta$ -arrestin 1-mediated signaling pathway underlies angiotensin II-induced aldosterone production in vitro and in vivo // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009. Т. 106. № 14. С. 5825.
213. M. Hoepfer M. и др. Pulmonary Hypertension // *Dtsch Arztebl Int.* 2017. Т. 114. № 5. С. 73–84.
214. Ma D. и др. Klf5 down-regulation induces vascular senescence through eIF5a depletion and mitochondrial fission // *PLoS Biol.* 2020. Т. 18. № 8.
215. Maarman G. и др. A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? // *Pulm Circ.* 2013. Т. 3. № 4. С. 739–756.
216. Madden J. A., Dawson C. A., Harder D. R. Hypoxia-induced activation in small isolated pulmonary arteries from the cat // *Journal of Applied Physiology.* 1985. Т. 59. № 1. С. 113–118.

217. Man F. S. de и др. Dysregulated renin-angiotensin-aldosterone system contributes to pulmonary arterial hypertension // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012. Т. 186. № 8. С. 780–789.
218. Mao L. и др. TIGIT signalling pathway negatively regulates CD4+ T-cell responses in systemic lupus erythematosus // *Immunology.* 2017. Т. 151. № 3. С. 280–290.
219. Mardjuki R. и др. Identification of the extracellular membrane protein ENPP3 as a major cGAMP hydrolase and innate immune checkpoint // *Cell Reports.* 2024. Т. 43. № 5.
220. Maron B. A., Leopold J. A. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the pathobiology of pulmonary arterial hypertension (2013 Grover Conference series) // *Pulm Circ.* 2014. Т. 4. № 2. С. 200–210.
221. Maron B. A., Leopold J. A. Emerging Concepts in the Molecular Basis of Pulmonary Arterial Hypertension (PAH): Part II: Neurohormonal Signaling Contributes to the Pulmonary Vascular and Right Ventricular Pathophenotype of PAH // *Circulation.* 2015. Т. 131. № 23. С. 2079–2091.
222. Maron B. A., Leopold J. A., Hemnes A. R. Metabolic syndrome, neurohumoral modulation, and pulmonary arterial hypertension // *Br J Pharmacol.* 2020. Т. 177. № 7. С. 1457–1471.
223. Marquardt T. и др. Coexpressed EphA receptors and ephrin-A ligands mediate opposing actions on growth cone navigation from distinct membrane domains // *Cell.* 2005. Т. 121. № 1. С. 127–139.
224. Masood A. и др. Plasma-Based Proteomics Profiling of Patients with Hyperthyroidism after Antithyroid Treatment // *Molecules.* 2020. Т. 25. № 12. С. 2831.
225. Mathew R. и др. Disruption of endothelial-cell caveolin-1alpha/raft scaffolding during development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension // *Circulation.* 2004. Т. 110. № 11. С. 1499–1506.
226. Matsuzaki N. и др. Potent and selective inhibition of angiotensin AT1 receptor signaling by RGS2: roles of its N-terminal domain // *Cell Signal.* 2011. Т. 23. № 6. С. 1041–1049.
227. McDonald R. A. и др. MicroRNA and vascular remodelling in acute vascular injury and pulmonary vascular remodelling // *Cardiovasc Res.* 2012. Т. 93. № 4. С. 594–604.
228. McLaughlin V. V. и др. Management of Pulmonary Arterial Hypertension // *Journal of the American College of Cardiology.* 2015. Т. 65. № 18. С. 1976–1997.
229. McMahon T. J., Hood J. S., Kadowitz P. J. Pulmonary vasodilator response to vagal stimulation is blocked by N omega-nitro-L-arginine methyl ester in the cat // *Circ. Res.* 1992. Т. 70. № 2. С. 364–369.
230. McMurtry M. S. и др. Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension // *J Clin Invest.* 2005. Т. 115. № 6. С. 1479–1491.
231. McMurtry M. S. и др. Overexpression of human bone morphogenetic protein receptor 2 does not ameliorate monocrotaline pulmonary arterial hypertension // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2007. Т. 292. № 4. С. L872-878.
232. Medvedeva N. A., Pankova N. V., Artemieva M. A. GENDER DIFFERENCES IN THE DEVELOPMENT OF PULMONARY HYPERTENSION: EFFECTS OF FEMALE SEX HORMONE ESTRADIOL // «Arterial'naya Gipertenziya» («Arterial Hypertension»). 2017. Т. 23. № 5. С. 421–432.
233. Mehra M. R. и др. Right heart failure: toward a common language // *J. Heart Lung Transplant.* 2014. Т. 33. № 2. С. 123–126.

234. Merlen C. и др. Intracrine endothelin signalling evokes IP3-dependent increases in nucleoplasmic Ca<sup>2+</sup> in adult cardiac myocytes // *J Mol Cell Cardiol.* 2013. Т. 62. С. 189–202.
235. Mészáros B., Erdos G., Dosztányi Z. IUPred2A: context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding // *Nucleic Acids Res.* 2018. Т. 46. № W1. С. W329–W337.
236. Miguez F., Archontoulis S., Dokoohaki H. *Nonlinear Regression Models and Applications // ASA, CSSA, and SSSA Books / под ред. B. Glaz, K. M. Yeater. Madison, WI, USA: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Inc., 2018. С. 401–447.*
237. Miller W. L., Pandey A. V., Flück C. E. Disordered Electron Transfer: New Forms of Defective Steroidogenesis and Mitochondriopathy // *J Clin Endocrinol Metab.* 2024. Т. 110. № 3. С. e574–e582.
238. Min L.-J. и др. Signaling mechanisms of angiotensin II in regulating vascular senescence // *Ageing Res Rev.* 2009. Т. 8. № 2. С. 113–121.
239. Mistry J. и др. Pfam: The protein families database in 2021 // *Nucleic Acids Res.* 2021. Т. 49. № D1. С. D412–D419.
240. Montezano A. C. и др. Redox signaling, Nox5 and vascular remodeling in hypertension // *Current Opinion in Nephrology and Hypertension.* 2015. Т. 24. № 5. С. 425–433.
241. Montezano A. C. и др. NADPH Oxidase 5 Is a Pro-Contractile Nox Isoform and a Point of Cross-Talk for Calcium and Redox Signaling-Implications in Vascular Function // *Journal of the American Heart Association.* 2018. Т. 7. № 12.
242. Mor I., Cheung E. C., Vousden K. H. Control of glycolysis through regulation of PFK1: old friends and recent additions // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2011. Т. 76. С. 211–216.
243. Moreno-Domínguez A. и др. Ca<sup>2+</sup> sensitization due to myosin light chain phosphatase inhibition and cytoskeletal reorganization in the myogenic response of skeletal muscle resistance arteries // *The Journal of Physiology.* 2013. Т. 591. № 5. С. 1235–1250.
244. Morgan M., Falcon S., Gentleman R. GSEABase: Gene set enrichment data structures and methods. , 2024.
245. Morris H. E. и др. Notch3 signalling and vascular remodelling in pulmonary arterial hypertension // *Clin Sci (Lond).* 2019. Т. 133. № 24. С. 2481–2498.
246. Morroni M. и др. Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004. Т. 101. № 48. С. 16801–16806.
247. Morrow D. и др. Notch-mediated CBF-1/RBP-J{ $\kappa$ }-dependent regulation of human vascular smooth muscle cell phenotype in vitro // *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005. Т. 289. № 5. С. C1188-1196.
248. Na S. и др. Cervical ganglion block attenuates the progression of pulmonary hypertension via nitric oxide and arginase pathways // *Hypertension.* 2014. Т. 63. № 2. С. 309–315.
249. Naeije R., Dewachter L. [Animal models of pulmonary arterial hypertension] // *Rev Mal Respir.* 2007. Т. 24. № 4 Pt 1. С. 481–496.
250. Nagai R. и др. KLF5/BTEB2, a Krüppel-like zinc-finger type transcription factor, mediates both smooth muscle cell activation and cardiac hypertrophy // *Adv Exp Med Biol.* 2003. Т. 538. С. 57–65; discussion 66.

251. Nagaraj G., Vellaichamy E. Triiodo-L-thyronine (T3) downregulates Npr1 gene (coding for natriuretic peptide receptor-A) transcription in H9c2 cells: involvement of  $\beta$ -AR-ROS signaling // *Endocrine*. 2024. T. 85. № 3. С. 1075–1090.
252. Nagasaki T. и др. Decrease in carotid intima-media thickness in hypothyroid patients after normalization of thyroid function // *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003. T. 59. № 5. С. 607–612.
253. Neggazi S. и др. TR $\alpha$  inhibits arterial renin-angiotensin system expression and prevents cholesterol accumulation in vascular smooth muscle cells // *Ann Endocrinol (Paris)*. 2019. T. 80. № 2. С. 89–95.
254. Nguyen Dinh Cat A. и др. Angiotensin II, NADPH Oxidase, and Redox Signaling in the Vasculature // *Antioxid Redox Signal*. 2013. T. 19. № 10. С. 1110–1120.
255. Nickel N. P. и др. Kidney dysfunction in patients with pulmonary arterial hypertension // *Pulm Circ*. 2017. T. 7. № 1. С. 38–54.
256. Nicolls M. R. и др. Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective // *Eur Respir J*. 2005. T. 26. № 6. С. 1110–1118.
257. Noe J. T., Mitchell R. A. MIF-Dependent Control of Tumor Immunity // *Front Immunol*. 2020. T. 11. С. 609948.
258. Nogueira-Ferreira R. и др. Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach // *Pulm Pharmacol Ther*. 2015. T. 35. С. 8–16.
259. Nolze A. и др. Calcineurin (PPP3CB) regulates angiotensin II-dependent vascular remodelling by potentiating EGFR signalling in mice // *Acta Physiol (Oxf)*. 2021. T. 233. № 3. С. e13715.
260. Norton C. E. и др. Enhanced depolarization-induced pulmonary vasoconstriction following chronic hypoxia requires EGFR-dependent activation of NAD(P)H oxidase 2 // *Antioxid Redox Signal*. 2013. T. 18. № 14. С. 1777–1788.
261. Ntiloudi D. и др. Pulmonary arterial hypertension: the case for a bioelectronic treatment // *Bioelectron Med*. 2019. T. 5.
262. Oddi F. J. и др. A nonlinear mixed-effects modeling approach for ecological data: Using temporal dynamics of vegetation moisture as an example // *Ecology and Evolution*. 2019. T. 9. № 18. С. 10225–10240.
263. Ogo T. Transthoracic Pulmonary Artery Denervation // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2019.
264. O’Hara-Wild M. и др. *distributional: Vectorised Probability Distributions.* , 2024.
265. Okada M., Nakajima K., Yaoita Y. Translational regulation by the 5’-UTR of thyroid hormone receptor  $\alpha$  mRNA // *J Biochem*. 2012. T. 151. № 5. С. 519–531.
266. Okumura K. и др. Carvedilol improves biventricular fibrosis and function in experimental pulmonary hypertension // *J. Mol. Med*. 2015. T. 93. № 6. С. 663–674.
267. Otsuki S. и др. Monocyte-released HERV-K dUTPase engages TLR4 and MCAM causing endothelial mesenchymal transition // *JCI Insight*. T. 6. № 15. С. e146416.
268. Ott J. A. и др. Evolution of surrogate light chain in tetrapods and the relationship between lengths of CDR H3 and VpreB tails // *Front Immunol*. 2022. T. 13. С. 1001134.

269. Oudit G. Y. и др. Angiotensin II-mediated oxidative stress and inflammation mediate the age-dependent cardiomyopathy in ACE2 null mice // *Cardiovasc. Res.* 2007. Т. 75. № 1. С. 29–39.
270. Oufattole M. и др. Ribonucleic acid polymerase II binding subunit 3 (Rpb3), a potential nuclear target of insulin-like growth factor binding protein-3 // *Endocrinology.* 2006. Т. 147. № 5. С. 2138–2146.
271. Owens G. K., Kumar M. S., Wamhoff B. R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease // *Physiol Rev.* 2004a. Т. 84. № 3. С. 767–801.
272. Owens G. K., Kumar M. S., Wamhoff B. R. Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease // *Physiological Reviews.* 2004b. Т. 84. № 3. С. 767–801.
273. Pacquelet S. и др. Inhibitory action of NoxA1 on dual oxidase activity in airway cells // *The Journal of Biological Chemistry.* 2008. Т. 283. № 36. С. 24649–24658.
274. Padia S. H., Carey R. M. AT2 RECEPTORS: BENEFICIAL COUNTER-REGULATORY ROLE IN CARDIOVASCULAR AND RENAL FUNCTION // *Pflugers Arch.* 2013. Т. 465. № 1. С. 99–110.
275. Paek J. и др. Multidimensional tracking of GPCR signaling via peroxidase-catalyzed proximity labeling // *Cell.* 2017. Т. 169. № 2. С. 338- 349.e11.
276. Pagès H. и др. AnnotationDbi: Manipulation of SQLite-based annotations in Bioconductor. , 2024.
277. Pagiatakis C. и др. A novel RhoA/ROCK-CPI-17-MEF2C signaling pathway regulates vascular smooth muscle cell gene expression // *J Biol Chem.* 2012. Т. 287. № 11. С. 8361–8370.
278. Pantos C. I. и др. Phenylephrine induced aortic vasoconstriction is attenuated in hyperthyroid rats // *Int Angiol.* 2001. Т. 20. № 2. С. 181–186.
279. Pappas M. и др. Thyroid hormone modulates the responsiveness of rat aorta to alpha1-adrenergic stimulation: an effect due to increased activation of beta2-adrenergic signaling // *Int Angiol.* 2009. Т. 28. № 6. С. 474–478.
280. Patil I. Visualizations with statistical details: The «ggstatsplot» approach // *Journal of Open Source Software.* 2021. Т. 6. № 61. С. 3167.
281. Patro R. и др. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression // *Nat Methods.* 2017. Т. 14. № 4. С. 417–419.
282. Pedersen T. L. patchwork: The Composer of Plots. , 2024a.
283. Pedersen T. L. gggraph: An Implementation of Grammar of Graphics for Graphs and Networks. , 2024b.
284. Pedersen T. L. ggforce: Accelerating «ggplot2». , 2024c.
285. Pedersen T. L. tidygraph: A Tidy API for Graph Manipulation. , 2025.
286. Peng B. и др. THBS1 mediates hypoxia driven EndMT in pulmonary hypertension // *Pulm Circ.* 2024. Т. 14. № 4. С. e70019.
287. Peng J. и др. EPHA3 regulates the multidrug resistance of small cell lung cancer via the PI3K/BMX/STAT3 signaling pathway // *Tumour Biol.* 2016. Т. 37. № 9. С. 11959–11971.

288. Perros F. и др. Pulmonary lymphoid neogenesis in idiopathic pulmonary arterial hypertension // *Am J Respir Crit Care Med*. 2012. Т. 185. № 3. С. 311–321.
289. Perschbacher K. J. и др. Regulators of G protein signaling in cardiovascular function during pregnancy // *Physiol Genomics*. 2018. Т. 50. № 8. С. 590–604.
290. Petersson J., Glenny R. W. Gas exchange and ventilation–perfusion relationships in the lung // *European Respiratory Journal*. 2014. Т. 44. № 4. С. 1023–1041.
291. Petrushanko I. Y. и др. Oxidation of Ca<sup>2+</sup>-Binding Domain of NADPH Oxidase 5 (NOX5): Toward Understanding the Mechanism of Inactivation of NOX5 by ROS // *PloS One*. 2016. Т. 11. № 7. С. e0158726.
292. Phillips M. I. Functions of angiotensin in the central nervous system // *Annu Rev Physiol*. 1987. Т. 49. С. 413–435.
293. Phillips M. I., Oliveira E. M. de. Brain renin angiotensin in disease // *J Mol Med (Berl)*. 2008. Т. 86. № 6. С. 715–722.
294. Pinheiro J., Bates D., R Core Team. *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models* // 2024.
295. Polato F. и др. DRAGO (KIAA0247), a new DNA damage-responsive, p53-inducible gene that cooperates with p53 as oncosuppressor. [Corrected] // *J Natl Cancer Inst*. 2014. Т. 106. № 4. С. dju053.
296. Porrello E. R., Delbridge L. M. D., Thomas W. G. The angiotensin II type 2 (AT<sub>2</sub>) receptor: an enigmatic seven transmembrane receptor // *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009. Т. 14. С. 958–972.
297. Prasad A. M. и др. Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase II Inhibition in Smooth Muscle Reduces Angiotensin II–Induced Hypertension by Controlling Aortic Remodeling and Baroreceptor Function // *J Am Heart Assoc*. 2015. Т. 4. № 6.
298. Pustejovsky J. *clubSandwich: Cluster-Robust (Sandwich) Variance Estimators with Small-Sample Corrections*. , 2024.
299. Pustejovsky J. E., Tipton E. Small-Sample Methods for Cluster-Robust Variance Estimation and Hypothesis Testing in Fixed Effects Models // *Journal of Business & Economic Statistics*. 2018. Т. 36. № 4. С. 672–683.
300. Qi Y.-X. и др. PDGF-BB and TGF- $\beta$ 1 on cross-talk between endothelial and smooth muscle cells in vascular remodeling induced by low shear stress // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011. Т. 108. № 5. С. 1908–1913.
301. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing* // 2020.
302. Rafikov R. и др. Gender Difference in Damage-Mediated Signaling Contributes to Pulmonary Arterial Hypertension // *Antioxid Redox Signal*. 2019. Т. 31. № 13. С. 917–932.
303. Rafikova O. и др. Recurrent inhibition of mitochondrial complex III induces chronic pulmonary vasoconstriction and glycolytic switch in the rat lung // *Respir Res*. 2018. Т. 19. № 1. С. 69.
304. Raj A. и др. Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells // *PLoS Biol*. 2006. Т. 4. № 10. С. e309.
305. Rakesh K. и др.  $\beta$ -Arrestin–Biased Agonism of the Angiotensin Receptor Induced by Mechanical Stress // *Science signaling*. Т. 3. № 125. С. ra46.

306. Ramos M. и др. Monocrotaline pyrrole induces Smad Nuclear Accumulation and Altered Signaling Expression in Human Pulmonary Arterial Endothelial Cells // *Vascul Pharmacol.* 2007. Т. 46. № 6. С. 439–448.
307. Reeve H. L. и др. Opposing effects of oxidants and antioxidants on K<sup>+</sup> channel activity and tone in rat vascular tissue // *Exp. Physiol.* 1995. Т. 80. № 5. С. 825–834.
308. Rey M., Hess P., Clozel M. Monocrotaline-induced pulmonary hypertension in Wistar rats // *Curr Protoc Pharmacol.* 2009. Т. Chapter 5. С. Unit 5.56.
309. Ritz C. и др. Dose-Response Analysis Using R // *PLoS ONE.* 2015. Т. 10. № 12. С. e0146021.
310. Rodig S. J. и др. The pre-B-cell receptor associated protein VpreB3 is a useful diagnostic marker for identifying c-MYC translocated lymphomas // *Haematologica.* 2010. Т. 95. № 12. С. 2056–2062.
311. Rodriguez J., Larson D. R. Transcription in Living Cells: Molecular Mechanisms of Bursting // *Annu Rev Biochem.* 2020. Т. 89. С. 189–212.
312. Rosenberg H. C., Rabinovitch M. Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 1988. Т. 255. № 6. С. H1484–H1491.
313. Rosnet O. и др. VPRED3: cDNA characterization and expression in human and chromosome mapping in human and mouse // *Cytogenet Cell Genet.* 1999. Т. 87. № 3–4. С. 205–208.
314. Rozec B. и др. Nebivolol, a vasodilating selective beta(1)-blocker, is a beta(3)-adrenoceptor agonist in the nonfailing transplanted human heart // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009. Т. 53. № 17. С. 1532–1538.
315. RStudio Team. RStudio: Integrated Development Environment for R // 2020.
316. Rudner X. L. и др. Subtype specific regulation of human vascular alpha(1)-adrenergic receptors by vessel bed and age // *Circulation.* 1999. Т. 100. № 23. С. 2336–2343.
317. Rukavina Mikusic N. L. и др. Angiotensin Receptors Heterodimerization and Trafficking: How Much Do They Influence Their Biological Function? // *Front Pharmacol.* 2020. Т. 11.
318. Russo S. C., Salas-Lucia F., Bianco A. C. Deiodinases and the Metabolic Code for Thyroid Hormone Action // *Endocrinology.* 2021. Т. 162. № 8. С. bqab059.
319. Ryan J. J. и др. Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension // *Can J Cardiol.* 2015. Т. 31. № 4. С. 391–406.
320. Ryczek N., Łyś A., Makołowska I. The Functional Meaning of 5'UTR in Protein-Coding Genes // *Int J Mol Sci.* 2023. Т. 24. № 3. С. 2976.
321. Sadamura-Takenaka Y. и др. HMGB1 Promotes the Development of Pulmonary Arterial Hypertension in Rats // *PLoS One.* 2014. Т. 9. № 7. С. e102482.
322. Sagliocchi S. и др. The key roles of thyroid hormone in mitochondrial regulation, at interface of human health and disease // *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* Т. 35. № 4–5. С. 231–240.
323. Saito T. и др. Upregulation of HERV-K is Linked to Immunity and Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension // *Circulation.* 2017. Т. 136. № 20. С. 1920–1935.

324. Salloum-Asfar S. и др. The Immediate and Late Effects of Thyroid Hormone (Triiodothyronine) on Murine Coagulation Gene Transcription // *PLoS One*. 2015. Т. 10. № 5. С. e0127469.
325. Samanta D., Almo S. C. Nectin family of cell-adhesion molecules: structural and molecular aspects of function and specificity // *Cell Mol Life Sci*. 2014. Т. 72. № 4. С. 645–658.
326. Sanges S. и др. B-cells in pulmonary arterial hypertension: friend, foe or bystander? // *Eur Respir J*. 2024. Т. 63. № 4. С. 2301949.
327. Santillo M. и др. NOX signaling in molecular cardiovascular mechanisms involved in the blood pressure homeostasis // *Front Physiol*. 2015. Т. 6.
328. Santos R. A. S. и др. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. Т. 100. № 14. С. 8258–8263.
329. Santos R. A. S., Ferreira A. J. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens*. 2007. Т. 16. № 2. С. 122–128.
330. Saxton S. N. и др. Mechanistic Links Between Obesity, Diabetes, and Blood Pressure: Role of Perivascular Adipose Tissue // *Physiological Reviews*. 2019. Т. 99. № 4. С. 1701–1763.
331. Schoch D. snahelper: «RStudio» Addin for Network Analysis and Visualization. , 2025.
332. Schouten B. J. и др. C-type natriuretic peptide forms in adult hyperthyroidism: correlation with thyroid hormones and markers of bone turnover // *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012. Т. 76. № 6. С. 790–796.
333. Schroeder A. и др. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements // *BMC Mol Biol*. 2006. Т. 7. С. 3.
334. Schultze A. E., Roth R. A. Chronic pulmonary hypertension--the monocrotaline model and involvement of the hemostatic system // *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 1998. Т. 1. № 4. С. 271–346.
335. Schumacher S. M., Koch W. J. Non-canonical roles of GRKs in cardiovascular signaling // *J Cardiovasc Pharmacol*. 2017. Т. 70. № 3. С. 129–141.
336. Schwenke D. O. и др. Changes in pulmonary blood flow distribution in monocrotaline compared with hypoxia-induced models of pulmonary hypertension: assessed using synchrotron radiation: // *Journal of Hypertension*. 2009. Т. 27. № 7. С. 1410–1419.
337. Senchenkova E. Y. и др. A critical role for both CD40 and VLA5 in angiotensin II-mediated thrombosis and inflammation // *FASEB J*. 2018. Т. 32. № 6. С. 3448–3456.
338. Seta K., Sadoshima J. Phosphorylation of tyrosine 319 of the angiotensin II type 1 receptor mediates angiotensin II-induced trans-activation of the epidermal growth factor receptor // *J Biol Chem*. 2003. Т. 278. № 11. С. 9019–9026.
339. Sharma P. и др. Thyroid hormone status regulates the expression of secretory phospholipases // *Biochem Biophys Res Commun*. 2014. Т. 444. № 1. С. 56–62.
340. Shi G., Yue G., Zhou R. EphA3 Functions are Regulated by Collaborating Phosphotyrosine Residues // *Cell Res*. 2010. Т. 20. № 11. С. 1263–1275.
341. Shi Y. и др. Both human ferredoxins 1 and 2 and ferredoxin reductase are important for iron-sulfur cluster biogenesis // *Biochim Biophys Acta*. 2012. Т. 1823. № 2. С. 484–492.

342. Shindo T. и др. Krüppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling // *Nature Medicine*. 2002. Т. 8. № 8. С. 856–863.
343. Shirai M. и др. Pulmonary vascular tone is dependent on the central modulation of sympathetic nerve activity following chronic intermittent hypoxia // *Basic Res. Cardiol*. 2014. Т. 109. № 5. С. 432.
344. Shirai M., Sada K., Ninomiya I. Effects of regional alveolar hypoxia and hypercapnia on small pulmonary vessels in cats // *Journal of Applied Physiology*. 1986. Т. 61. № 2. С. 440–448.
345. Silva Gonçalves Bos D. da и др. Renal Denervation Reduces Pulmonary Vascular Remodeling and Right Ventricular Diastolic Stiffness in Experimental Pulmonary Hypertension // *JACC Basic Transl Sci*. 2017. Т. 2. № 1. С. 22–35.
346. Silva Novaes A. da и др. Intracrine action of angiotensin II in mesangial cells: subcellular distribution of angiotensin II receptor subtypes AT1 and AT2 // *Mol Cell Biochem*. 2018. Т. 448. № 1–2. С. 265–274.
347. Simões e Silva A. и др. ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis // *Br J Pharmacol*. 2013. Т. 169. № 3. С. 477–492.
348. Sisirak V. и др. Digestion of Chromatin in Apoptotic Cell Microparticles Prevents Autoimmunity // *Cell*. 2016. Т. 166. № 1. С. 88–101.
349. Soe N. N. и др. Cyclophilin A is required for angiotensin II-induced p47phox translocation to caveolae in vascular smooth muscle cells // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2013. Т. 33. № 9. С. 2147–2153.
350. Sommer N. и др. Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms // *European Respiratory Journal*. 2008. Т. 32. № 6. С. 1639–1651.
351. Spyropoulos F. и др. Echocardiographic markers of pulmonary hemodynamics and right ventricular hypertrophy in rat models of pulmonary hypertension // *Pulm Circ*. 2020. Т. 10. № 2. С. 2045894020910976.
352. Staeger M. S., Emmer A. Editorial: Endogenous Viral Elements—Links Between Autoimmunity and Cancer? // *Front Microbiol*. 2018. Т. 9. С. 3171.
353. Steckelings U. M., Kaschina E., Unger T. The AT2 receptor—a matter of love and hate // *Peptides*. 2005. Т. 26. № 8. С. 1401–1409.
354. Steffes Lea C. и др. A Notch3-Marked Subpopulation of Vascular Smooth Muscle Cells Is the Cell of Origin for Occlusive Pulmonary Vascular Lesions // *Circulation*. 2020. Т. 142. № 16. С. 1545–1561.
355. Stenmark K. R. и др. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009. Т. 297. № 6. С. L1013-1032.
356. Stenmark K. R., Fagan K. A., Frid M. G. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms // *Circ. Res*. 2006. Т. 99. № 7. С. 675–691.
357. Stenmark K. R., McMurtry I. F. Vascular Remodeling Versus Vasoconstriction in Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertension A Time for Reappraisal? // *Circ Res*. 2005. Т. 97. № 2. С. 95–98.
358. Studer S. M., Gilkin R. J. Clinical trial designs in PAH: shifting from functional measurements to long-term clinical outcomes // *Am J Manag Care*. 2014. Т. 20. № 6 Suppl. С. S115-122.

359. Suh Y. A. и др. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1 // *Nature*. 1999. Т. 401. № 6748. С. 79–82.
360. Sun C. и др. The prevalence and specificity of local protein synthesis during neuronal synaptic plasticity // *Sci Adv*. 2021. Т. 7. № 38. С. eabj0790.
361. Tadevosyan A. и др. Nuclear-delimited Angiotensin Receptor-mediated Signaling Regulates Cardiomyocyte Gene Expression // *J Biol Chem*. 2010. Т. 285. № 29. С. 22338–22349.
362. Tadevosyan A. и др. Intracellular Angiotensin-II Interacts With Nuclear Angiotensin Receptors in Cardiac Fibroblasts and Regulates RNA Synthesis, Cell Proliferation, and Collagen Secretion // *J Am Heart Assoc*. 2017. Т. 6. № 4.
363. Takai S. и др. Chymase as a novel target for the prevention of vascular diseases // *Trends Pharmacol. Sci*. 2004. Т. 25. № 10. С. 518–522.
364. Takezako T. и др. Current Topics in Angiotensin II Type 1 Receptor Research: Focus on Inverse Agonism, Receptor Dimerization and Biased Agonism // *Pharmacol Res*. 2017. Т. 123. С. 40–50.
365. Tan A. Y. и др. Autonomic nerves in pulmonary veins // *Heart Rhythm*. 2007. Т. 4. № 3 Suppl. С. S57–S60.
366. Tang D. и др. The multifunctional protein HMGB1: 50 years of discovery // *Nat Rev Immunol*. 2023. Т. 23. № 12. С. 824–841.
367. Tang J. и др. Structure, regulation, and biological functions of TIGAR and its role in diseases // *Acta Pharmacol Sin*. 2021. Т. 42. № 10. С. 1547–1555.
368. Tang Y. и др. p22phox promotes Ang-II-induced vascular smooth muscle cell phenotypic switch by regulating KLF4 expression // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019. Т. 514. № 1. С. 280–286.
369. Tang Y. и др. TBX20 Improves Contractility and Mitochondrial Function During Direct Human Cardiac Reprogramming // *Circulation*. 2022. Т. 146. № 20. С. 1518–1536.
370. Teixeira L. B. и др. Ang-(1-7) is an endogenous  $\beta$ -arrestin-biased agonist of the AT1 receptor with protective action in cardiac hypertrophy // *Sci Rep*. 2017. Т. 7.
371. Teufel F. и др. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models // *Nat Biotechnol*. 2022. Т. 40. № 7. С. 1023–1025.
372. Thenappan T. и др. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management // *BMJ*. 2018. Т. 360. С. j5492.
373. Thumhuri V. и др. DeepLoc 2.0: multi-label subcellular localization prediction using protein language models // *Nucleic Acids Res*. 2022. Т. 50. № W1. С. W228–W234.
374. Tian L. и др. TSH stimulates the proliferation of vascular smooth muscle cells // *Endocrine*. 2014. Т. 46. № 3. С. 651–658.
375. Tiedemann F. gghalves: Compose Half-Half Plots Using Your Favourite Geoms // 2020.
376. Tinajero M. G., Gotlieb A. I. Recent Developments in Vascular Adventitial Pathobiology: The Dynamic Adventitia as a Complex Regulator of Vascular Disease // *The American Journal of Pathology*. 2020. Т. 190. № 3. С. 520–534.

377. Tirupula K. С. и др. G Protein-Coupled Receptors Directly Bind Filamin A with High Affinity and Promote Filamin Phosphorylation // *Biochemistry*. 2015. Т. 54. № 44. С. 6673–6683.
378. Touyz R. М. и др. NOX5: Molecular biology and pathophysiology // *Exp Physiol*. 2019. Т. 104. № 5. С. 605–616.
379. Truong V., Anand-Srivastava M. B., Srivastava A. K. Role of cyclic AMP response element binding protein (CREB) in angiotensin II-induced responses in vascular smooth muscle cells // *Can J Physiol Pharmacol*. 2020.
380. Tu H., Zhang D., Li Y.-L. Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Arterial Baroreceptor Remodeling in Cardiovascular Diseases and Diabetes // *Neurosci Bull*. 2018. Т. 35. № 1. С. 98–112.
381. Turu G., Balla A., Hunyady L. The Role of  $\beta$ -Arrestin Proteins in Organization of Signaling and Regulation of the AT1 Angiotensin Receptor // *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019. Т. 10.
382. Tyler R. С. и др. Variable expression of endothelial NO synthase in three forms of rat pulmonary hypertension // *Am J Physiol*. 1999. Т. 276. № 2. С. L297-303.
383. Vadasz Z., Toubi E. Semaphorins: Their Dual Role in Regulating Immune-Mediated Diseases // *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2014. Т. 47. № 1. С. 17–25.
384. Vadasz Z., Toubi E. Semaphorin3A: A potential therapeutic tool in immune-mediated diseases // *Eur J Rheumatol*. 2018. Т. 5. № 1. С. 58–61.
385. Vaillancourt M. и др. Autonomic nervous system involvement in pulmonary arterial hypertension // *Respir Res*. 2017. Т. 18.
386. Valenzuela R. и др. Mitochondrial angiotensin receptors in dopaminergic neurons. Role in cell protection and aging-related vulnerability to neurodegeneration // *Cell Death Dis*. 2016. Т. 7. № 10. С. e2427.
387. Varma Shrivastav S. и др. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3): Unraveling the Role in Mediating IGF-Independent Effects Within the Cell // *Front Cell Dev Biol*. 2020. Т. 8. С. 286.
388. Varshney R. и др. Monocrotaline-induced Pulmonary Hypertension Involves Downregulation of Anti-aging Protein Klotho and eNOS activity // *Hypertension*. 2016. Т. 68. № 5. С. 1255–1263.
389. Velez-Roa S. и др. Increased sympathetic nerve activity in pulmonary artery hypertension // *Circulation*. 2004. Т. 110. № 10. С. 1308–1312.
390. Venema R. С. и др. Angiotensin II-induced association of phospholipase C $\gamma$ 1 with the G-protein-coupled AT1 receptor // *J Biol Chem*. 1998. Т. 273. № 13. С. 7703–7708.
391. Villar-Cheda B. и др. The intracellular angiotensin system buffers deleterious effects of the extracellular paracrine system // *Cell Death Dis*. 2017. Т. 8. № 9. С. e3044.
392. Villela D. и др. Angiotensin type 2 receptor (AT2R) and receptor Mas: a complex liaison // *Clin. Sci*. 2015. Т. 128. № 4. С. 227–234.
393. Vitting-Seerup K. и др. spliceR: an R package for classification of alternative splicing and prediction of coding potential from RNA-seq data // *BMC Bioinformatics*. 2014. Т. 15. С. 81.
394. Vitting-Seerup K., Sandelin A. The Landscape of Isoform Switches in Human Cancers // *Mol Cancer Res*. 2017. Т. 15. № 9. С. 1206–1220.

395. Vitting-Seerup K., Sandelin A. IsoformSwitchAnalyzeR: analysis of changes in genome-wide patterns of alternative splicing and its functional consequences // *Bioinformatics*. 2019. Т. 35. № 21. С. 4469–4471.
396. Voelkel N. F., Tuder R. M. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease? // *J Clin Invest*. 2000. Т. 106. № 6. С. 733–738.
397. Wade M. и др. Functional analysis and consequences of Mdm2 E3 ligase inhibition in human tumor cells // *Oncogene*. 2012. Т. 31. № 45. С. 4789–4797.
398. Wang H. и др. RPL39 Was Associated With Sex Differences in Pulmonary Arterial Hypertension // *Can Respir J*. 2025. Т. 2025. С. 7139235.
399. Wang P. plotthis: High-Level Plotting Built Upon «ggplot2» and Other Plotting Packages. , 2025.
400. Wang W. и др. p53/PUMA expression in human pulmonary fibroblasts mediates cell activation and migration in silicosis // *Sci Rep*. 2015. Т. 5. С. 16900.
401. Waqas S. F. H. и др. Neuropeptide FF increases M2 activation and self-renewal of adipose tissue macrophages // *J Clin Invest*. Т. 127. № 7. С. 2842–2854.
402. Weikum E. R., Liu X., Ortlund E. A. The nuclear receptor superfamily: A structural perspective // *Protein Sci*. 2018. Т. 27. № 11. С. 1876–1892.
403. Wensel R. и др. Impaired cardiac autonomic control relates to disease severity in pulmonary hypertension // *Eur. Respir. J*. 2009. Т. 34. № 4. С. 895–901.
404. Wickham H. и др. Welcome to the tidyverse // *Journal of Open Source Software*. 2019. Т. 4. № 43. С. 1686.
405. Willis S. N. и др. Environmental sensing by mature B cells is controlled by the transcription factors PU.1 and SpiB // *Nat Commun*. 2017. Т. 8. № 1. С. 1426.
406. Wong T.-H. и др. Dendritic cells treated with a prostaglandin I2 analog, iloprost, promote antigen-specific regulatory T cell differentiation in mice // *International Immunopharmacology*. 2020. Т. 79. С. 106106.
407. Wösten-van Asperen R. M. и др. Acute respiratory distress syndrome leads to reduced ratio of ACE/ACE2 activities and is prevented by angiotensin-(1-7) or an angiotensin II receptor antagonist // *J. Pathol*. 2011. Т. 225. № 4. С. 618–627.
408. Xiao G. и др. RNA sequencing analysis of monocrotaline-induced PAH reveals dysregulated chemokine and neuroactive ligand receptor pathways // *Aging (Albany NY)*. 2020. Т. 12. № 6. С. 4953–4969.
409. Xie L. и др. Thyrotropin induces atherosclerosis by upregulating large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel subunits // *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2024. Т. 583. С. 112145.
410. Xu J. и др. Myocyte enhancer factors 2A and 2C induce dilated cardiomyopathy in transgenic mice // *J Biol Chem*. 2006. Т. 281. № 14. С. 9152–9162.
411. Xu S. и др. Pulmonary hypertension as a manifestation of mitochondrial disease: A case report and review of the literature // *Medicine (Baltimore)*. 2017. Т. 96. № 46. С. e8716.
412. Yalcin A. и др. Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer // *Exp Mol Pathol*. 2009. Т. 86. № 3. С. 174–179.

413. Yang M. и др. Role of ROS-TRPM7-ERK1/2 axis in high concentration glucose-mediated proliferation and phenotype switching of rat aortic vascular smooth muscle cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017. Т. 494. № 3. С. 526–533.
414. Yildiz P. Molecular mechanisms of pulmonary hypertension // *Clinica Chimica Acta*. 2009. Т. 403. № 1–2. С. 9–16.
415. You D. и др. High blood pressure reduction reverses angiotensin II type 2 receptor-mediated vasoconstriction into vasodilation in spontaneously hypertensive rats. // *Circulation*. 2005. Т. 111. № 8. С. 956–957.
416. Young S. K., Wek R. C. Upstream Open Reading Frames Differentially Regulate Gene-specific Translation in the Integrated Stress Response // *J Biol Chem*. 2016. Т. 291. № 33. С. 16927–16935.
417. Yu J., Zhang L. PUMA, a potent killer with or without p53 // *Oncogene*. 2008. Т. 27. № Suppl 1. С. S71–S83.
418. Yu X. и др. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells // *Nat Immunol*. 2009. Т. 10. № 1. С. 48–57.
419. Zeng C. и др. Prostaglandin and prostaglandin receptors: present and future promising therapeutic targets for pulmonary arterial hypertension // *Respir Res*. 2023. Т. 24. С. 263.
420. Zeng S.-Y. и др. Protein Arginine Methyltransferase 2 Inhibits Angiotensin II-Induced Proliferation and Inflammation in Vascular Smooth Muscle Cells // *Biomed Res Int*. 2018. Т. 2018. С. 1547452.
421. Zeng X. и др. DNA polymerase eta is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes // *Nat Immunol*. 2001. Т. 2. № 6. С. 537–541.
422. Zhang D. и др. Effect of angiotensin II on voltage-gated sodium currents in aortic baroreceptor neurons and arterial baroreflex sensitivity in heart failure rats // *J Hypertens*. 2015. Т. 33. № 7. С. 1401–1410.
423. Zhang F. и др. Proliferative and Survival Effects of PUMA Promote Angiogenesis // *Cell Reports*. 2012a. Т. 2. № 5. С. 1272–1285.
424. Zhang H. и др. Structural Basis for Selectivity and Diversity in Angiotensin II Receptors // *Nature*. 2017. Т. 544. № 7650. С. 327–332.
425. Zhang N. и др. Transcriptomic and proteomic investigations identify PI3K-akt pathway targets for hyperthyroidism management in rats via polar iridoids from radix *Scrophularia* // *Heliyon*. 2024. Т. 10. № 12. С. e33072.
426. Zhang R. и др. Two Distinct Calmodulin Binding Sites in the Third Intracellular Loop and Carboxyl Tail of Angiotensin II (AT1A) Receptor // *PLoS One*. 2013a. Т. 8. № 6.
427. Zhang T. и др. CCL11 (Eotaxin) Promotes the Advancement of Aging-Related Cardiovascular Diseases // *Rev Cardiovasc Med*. 2025. Т. 26. № 2. С. 26020.
428. Zhang X. и др. The Angiotensin II Type 1 Receptor C-Terminal Lys Residues Interact with Tubulin and Modulate Receptor Export Trafficking // *PLoS One*. 2013b. Т. 8. № 2.
429. Zhang X. и др. Expression profiles of six circulating microRNAs critical to atherosclerosis in patients with subclinical hypothyroidism: a clinical study // *J Clin Endocrinol Metab*. 2014. Т. 99. № 5. С. E766-774.

430. Zhang Z. и др. Upregulation of TRPM7 channels by angiotensin II triggers phenotypic switching of vascular smooth muscle cells of ascending aorta // *Circ Res.* 2012b. Т. 111. № 9. С. 1137–1146.
431. Zhao Y. и др. Angiopoietin-Like 7 Contributes to Angiotensin II-Induced Proliferation, Inflammation and Apoptosis in Vascular Smooth Muscle Cells // *Pharmacology.* 2019. Т. 104. № 5–6. С. 226–234.
432. Zheng B. и др. Krüppel-like factor 4 inhibits proliferation by platelet-derived growth factor receptor beta-mediated, not by retinoic acid receptor alpha-mediated, phosphatidylinositol 3-kinase and ERK signaling in vascular smooth muscle cells // *J Biol Chem.* 2009. Т. 284. № 34. С. 22773–22785.
433. Zhu Q. и др. Prostate transmembrane androgen inducible protein 1 (PMEPA1): regulation and clinical implications // *Front Oncol.* 2023. Т. 13. С. 1298660.
434. Zhu Z. и др. Echocardiographic assessment of right ventricular function in experimental pulmonary hypertension // *Pulm Circ.* 2019. Т. 9. № 2. С. 2045894019841987.
435. Zini S. и др. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996. Т. 93. № 21. С. 11968–11973.
436. Handbook of Quantile Regression / под ред. R. Koenker и др. New York: Chapman and Hall/CRC, 2017. 483 с.