

УДК 616.24-005.7

DOI: 10.24884/1682-6655-2022-21-3-72-81

А. А. КАРПОВ^{1, 2}, Д. Д. ВАУЛИНА¹, А. М. МИХАЙЛОВА¹,
С. С. СМЕРНОВ^{1, 3}, Л. А. ШИЛЕНКО^{1, 3}, Н. А. АНИКИН¹,
З. И. ЧЕПУРНОЙ^{1, 3}, А. В. ВОРОТИЛОВ¹, А. Г. СТАФЕЕВА¹,
Н. С. БУНЕНКОВ^{1, 3}, Д. Ю. ИВКИН², М. М. ГАЛАГУДЗА^{1, 3}

Исследование антифибротического действия ингибиторов JAK для профилактики и лечения хронической тромбоэмболической легочной гипертензии

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8
E-mail: Karpov_AA@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию 19.07.22 г.; принята к печати 19.08.22 г.

Резюме

Введение. Хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия (ХТЭЛГ) является одним из наиболее тяжелых осложнений тромбоэмболии легочной артерии (ТЭЛА). Фиброзное ремоделирование сосудов малого круга кровообращения на фоне ХТЭЛГ приводит к необратимому увеличению жесткости сосудистой стенки и снижению эффективности лечения ХТЭЛГ. Участие янус-киназы (JAK) в регуляции процессов воспаления и фиброза в сосудистой стенке и легочной ткани позволяет предположить возможную эффективность ингибиторов JAK 1,2 (иJAK) в лечении ХТЭЛГ. **Цель** – исследование антифибротического действия иJAK для профилактики и лечения ХТЭЛГ. **Материалы и методы.** Исследование проводили на крысах-самцах стока Wistar. Моделирование ХТЭЛГ выполняли путем многократной эмболизации сосудистого русла частично биodeградируемыми микросферами из альгината натрия. Через 2 недели после последнего введения микросфер было начато применение иJAK в низких, средних и высоких дозах. Для оценки эффективности применяемой субстанции были использованы тредмил-тест, эхокардиографическое исследование, катетеризация сердца с манометрией правого желудочка (ПЖ), гистологическое исследование легких. **Результаты.** Было продемонстрировано значимое снижение толерантности к физической нагрузке во всех точках наблюдения животных, перенесших эмболизацию сосудистого русла, по сравнению со здоровыми животными. Отмечалось значимое повышение среднего давления в ПЖ в группе плацебо ($15,5 \pm 7,7$ мм рт. ст.) и группе применения низких доз иJAK ($13,4 \pm 6,4$ мм рт. ст.), по сравнению со здоровыми животными ($9,4 \pm 2,2$ мм рт. ст.). Индекс гипертрофии сосудистой стенки ветвей легочной артерии был значимо ниже в группе применения средней дозы иJAK, по сравнению с группой плацебо ($54,9 \pm 19,0$ и $68,9 \pm 23,1$ % соответственно). **Заключение.** Таким образом, подавление асептического воспаления и опосредованного им фиброза с помощью иJAK приводит к снижению выраженности ремоделирования малого круга кровообращения в экспериментальной модели ХТЭЛГ. Этот подход может быть использован в комплексном лечении и профилактике ХТЭЛГ.

Ключевые слова: тромбоэмболия легочной артерии, хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия, альгинат натрия, микросферы, экспериментальная модель, крыса, ХТЭЛГ, фиброзное ремоделирование, янус-киназа

Для цитирования: Карпов А. А., Ваулина Д. Д., Михайлова А. М., Смирнов С. С., Шиленко Л. А., Аникин Н. А., Чепурной З. И., Воротилов А. В., Стафеева А. Г., Буненков Н. С., Ивкин Д. Ю., Галагудза М. М. Исследование антифибротического действия ингибиторов JAK для профилактики и лечения хронической тромбоэмболической легочной гипертензии. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2022;21(3):72–81. Doi: 10.24884/1682-6655-2022-21-3-72-81.

A. A. KARPOV^{1, 2}, D. D. VAULINA¹, A. M. MIKHAILOVA¹,
S. S. SMIRNOV^{1, 3}, L. A. SHILENKO^{1, 3}, N. A. ANIKIN¹,
Z. I. CHEPURNOY^{1, 3}, A. V. VOROTILOV¹, A. G. STAFEEVA¹,
N. S. BUNENKOV^{1, 3}, D. Yu. IVKIN², M. M. GALAGUDZA^{1, 3}

Study of the JAK inhibitors antifibrotic activity for the prevention and treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension

¹ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

² Akkuratova str., Saint Petersburg, Russia, 197341

³ Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia

14, Professor Popov str. 14, Saint Petersburg, Russia, 197376

³ Pavlov University, Saint Petersburg, Russia

6-8, L'va Tolstogo street, Saint Petersburg, Russia, 197022

E-mail: Karpov_AA@almazovcentre.ru

Received 19.07.22; accepted 19.08.22

Summary

Introduction. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) is the most common complication of pulmonary thromboembolism (PE). Fibrous remodeling of the pulmonary circulation vessels against the background of CTEPH leads to an irreversible increase of the vessel wall stiffness and the ineffectiveness of CTEPH treatment. The involvement of Janus kinase (JAK) in the regulation of vascular wall and lung tissue inflammation and fibrosis allows for the possible effectiveness of JAK 1,2 inhibitors (iJAK) in the course of CTEPH. **Purpose** – to study the antifibrotic effect of iJAK for the prevention and treatment of CTEPH. **Materials and methods.** The study was conducted on male Wistar rats. Modeling of CTEPH was performed by sequential embolization of the vascular bed with partially biodegradable sodium alginate microspheres. 2 weeks after the last administration of the microspheres, low, medium and high doses of iJAK were initiated. To assess the effectiveness of the substance, the following tests were used: treadmill test, echocardiography, cardiac catheterization with right ventricular (RV) manometry, histological examination of the lungs. **Results.** Animals undergone vascular embolization demonstrated decreased exercise tolerance at all observation points compared to healthy animals. The placebo group, in contrast with the group getting treatment and iJAK, was found to have an increased mean RV pressure compared to healthy animals. There was an increase in mean RV pressure in the placebo group (15.5 ± 7.7 mmHg) and in the low dose and iJAK group (13.4 ± 6.4 mmHg) compared with healthy animals (9.4 ± 2.2 mmHg). Vascular hypertrophy of the pulmonary artery branches was lower in group getting average dosages and iJAK compared with the placebo group (54.9 ± 19.0 and 68.9 ± 23.1 %, respectively). Thus, the suppression by iJAK of aseptic inflammation and following fibrosis leads to the decreasing of severity of pulmonary circulation remodeling in the experimental model of CTEPH. This approach can be used in the comprehensive bypass and prevention of CTEPH.

Keywords: pulmonary embolism, chronic thromboembolic pulmonary hypertension, sodium alginate, microspheres, experimental model, rat, CTEPH, fibrous remodeling, Janus kinase

For citation: Karpov A. A., Vaulina D. D., Mikhailova A. M., Smirnov S. S., Shilenko L. A., Anikin N. A., Chepurnoy Z. I., Vorotilov A. V., Stafeeva A. G., Bunenkov N. S., Ivkin D. Yu., Galagudza M. M. Study of the JAK inhibitors antifibrotic activity for the prevention and treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Regional hemodynamics and microcirculation*. 2022;21(3):72–81. Doi: 10.24884/1682-6655-2022-21-3-72-81.

Введение

Тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА) по распространенности занимает 3-е место среди всех сердечно-сосудистых заболеваний. Стоит учесть, что риск венозных тромбоэмболий у пациентов моложе 45 лет варьируется в диапазоне 1,0–1,5 на 1000 человек в год и увеличивается почти в 2 раза с каждым десятилетием, а значит, лечение этой категории больных ложится тяжелым бременем на систему здравоохранения [1]. У 4–9 % пациентов с острой ТЭЛА течение заболевания осложняется развитием хронической тромбоэмболической легочной гипертензии (ХТЭЛГ), которая ассоциирована с крайне высокой летальностью [2]. Пятилетняя выживаемость больных с ХТЭЛГ, получающих только терапию пероральными антикоагулянтами, при уровне среднего

давления в легочной артерии (ЛА) более 30 мм рт. ст. не превышает 10 % [3].

В настоящее время у пациентов с высоким риском развития ХТЭЛГ рекомендуется наблюдение и прием оральных антикоагулянтов в течение не менее 3 месяцев. В случае сохранения легочной гипертензии, методами дальнейшего лечения являются тромбэндартерэктомия, баллонная ангиопластика ЛА или специфическая терапия с использованием современных вазодилататоров малого круга кровообращения (МКК). Активное воздействие на процесс ремоделирования сосудистого русла на ранних этапах после ТЭЛА способно снизить риск развития ХТЭЛГ.

Фиброзное ремоделирование сосудов МКК на фоне легочной гипертензии и воспаление после ТЭЛА приводит к необратимому увеличению

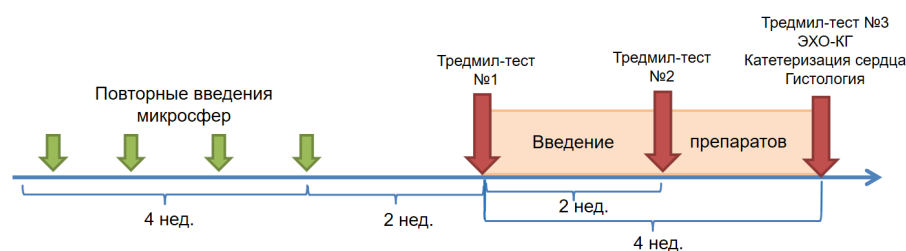


Рис. 1. Схема дизайна исследования

Fig. 1. Scheme of the study design

жесткости сосудистой стенки и снижению эффективности вазодилатирующей терапии и хирургического лечения ХТЭЛГ.

В ранее проведенных исследованиях было показано, что JAK-STAT-сигнальный путь является важным каскадом, опосредующим эффекты широкого спектра цитокинов, таких как TGF- β [4, 5], тромбоцитарного фактора роста (PDGF) [6], интерлейкина (ИЛ) 6 [7], гранулоцитарного колониестимулирующего фактора роста (G-CSF) [8]. Блокирование эффектов этих цитокинов приводит к снижению синтеза коллагена, подавлению пролиферации гладкомышечных клеток, фибробластов, эндотелиоцитов, противовоспалительному эффекту. При этом с активацией транскрипции сигнального пути JAK-STAT связывают патогенез ряда воспалительных и аутоиммунных заболеваний. Так, в настоящее время подтверждена эффективность применения ингибиторов JAK (иJAK) в лечении таких иммуопосредованных заболеваний, как ревматоидный артрит, псориаз, ряд воспалительных заболеваний кишечника и реакции «трансплантат против хозяина» [9, 10]. Аналогов применения данного класса препаратов для профилактики развития и лечения ХТЭЛГ в настоящее время нет, однако участие JAK/STAT-сигнального пути в регуляции процессов воспаления и фиброза в сосудистой стенке и легочной ткани позволяет предположить его возможную эффективность в лечении ХТЭЛГ, а также других форм легочной гипертензии [11, 12].

Целью работы стало исследование антифибротического действия ингибитора JAK 1,2 для профилактики и лечения хронической тромбоэмболической легочной гипертензии.

Материалы и методы исследования

Все эксперименты были проведены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального института здоровья, 8-е изд., 2011 г.). Процедуры с животными были рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией ФГБОУ ВО «СПХФУ» МЗ РФ (протокол бэк СПХФУ Rats-02.2019-5 от 12 февраля 2019 г.).

Животные. В работе были использованы крысы-самцы стока Wistar конвенциональной категории массой 225 ± 28 г. Все животные содержались в стандартизированных условиях вивария барьерного типа, имели доступ к полнорационному гранулированному корму и воде *ad libitum*.

Эмболизирующие частицы. В качестве эмболизирующих частиц в исследовании были использованы

частично биodeградируемые микросферы (МС), полученные из ультрачистого альгината натрия (*Sigma-Aldrich*, США) с помощью электростатического инкапсулятора В-390 (*Buchi*, Швейцария) [13, 14]. В качестве стабилизирующего агента использовали 2 %-й раствор хлорида бария. Целевой размер МС – 180 ± 30 мкм. Все микросферы производились в стерильных условиях.

Расчет дозы ингибитора JAK. В качестве ингибитора JAK 1,2 был использован руксолитиниб (*MedChemExpress LLC*, США). Расчет исследуемых доз для лабораторных животных производили исходя из диапазона доз препарата, используемого у человека по различным показаниям: от 10 до 50 мг/сутки. Для пересчета использовалась формула: (доза препарата / средняя масса тела человека (70 кг)) $\cdot 5,9$ [15]. Схожие дозы руксолитиниба были использованы и в других экспериментальных исследованиях на крысах [16].

Протокол эксперимента. Микросферы в объеме 50 мкл были суспензированы в 1 мл физиологического раствора и вводились в хвостовую вену 8 раз с интервалом 4 дня.

Через 2 недели после последнего введения микросфер выполнялся тредмил-тест, по результатам которого все животные были равномерно разделены на 5 экспериментальных групп по толерантности к физической нагрузке. В качестве отрицательного контроля была использована группа здоровых животных (рис. 1).

Группы животных:

- здоровые животные (n=8);
- плацебо (n=8) – животным через 2 недели после последнего введения МС внутривенно вводился физиологический раствор в течение 4 недель;
- низкие дозы иJAK (н/д иJAK) (n=8) – через 2 недели после последнего введения МС *per os* вводился иJAK в дозе 0,43 мг/кг $\cdot 2$ р./д. в течение 4 недель (что соответствует 10 мг в сутки у человека);
- средние дозы иJAK (ср/д иJAK) (n=8) – через 2 недели после последнего введения МС *per os* вводился ингибитор JAK в дозе 1,29 мг/кг $\cdot 2$ р./д. в течение 4 недель (что соответствует 30 мг в сутки у человека);
- высокие дозы иJAK (в/д иJAK) (n=8) – через 2 недели после последнего введения МС *per os* вводился иJAK в дозе 2,14 мг/кг $\cdot 2$ р./д. в течение 4 недель (что соответствует 50 мг в сутки у человека).

Через 2 и 4 недели после начала введения исследуемых субстанций проводился тредмил-тест для оценки изменения толерантности к физической нагрузке на фоне лечения.

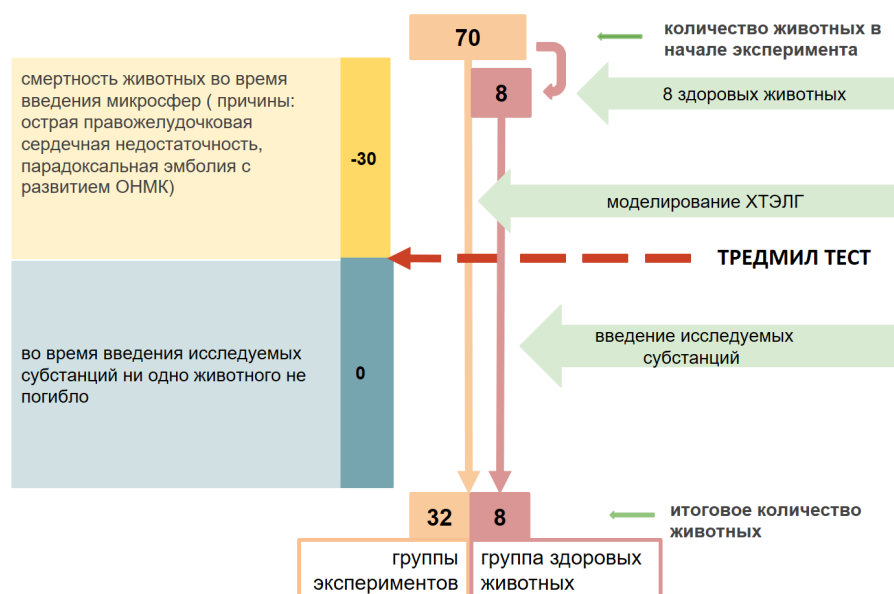


Рис. 2. Схема потерь экспериментальных животных.

Fig. 2. Scheme of loss of experimental animals

Через 4 недели после начала терапии иЯК проводилось изучение морфофункциональных показателей сердечно-сосудистой системы: эхокардиографическое исследование, катетеризация правого желудочка (ПЖ) с манометрией. Исследование влияния иЯК на ремоделирование сосудистого русла МКК проводилось с помощью гистологического исследования.

1. *Тредмил-тест* выполнялся через 2 недели после последнего введения МС и через 2 и 4 недели после начала введения исследуемых субстанций. Для выполнения пробы была использована установка Treadmill LE8710 (*Harvard Apparatus*, США). В ходе тестирования применяли протокол с постепенным наращиванием скорости вращения ленты тредмила, каждые 30 с на 5 м/мин, до достижения скорости 40 м/мин. В ходе тестирования были оценена дистанция, которую пробежало животное за время тестирования (метры).

2. *Эхокардиографическое исследование* (Эхо-КГ) было выполнено через 4 недели после начала введения иЯК. Для выполнения исследования была использована ультразвуковая установка высокого разрешения (MyLabTouchSL 3116; *Essaot*, Италия) с сосудистым линейным датчиком (частота – 13 МГц, глубина сканирования – 2 см). В ходе проведения Эхо-КГ животные были наркотизированы ингаляцией изофлурана с помощью системы для газовой анестезии SomnoSuite Low-Flow Anesthesia System (*Kent Scientific*, США) и размещались на подогреваемом столике (TCAT-2LV controller, *Physitemp Instruments Inc.*, Clifton, NJ, USA) в положении на спине. Основными параметрами, оцениваемыми при исследовании, были: 1) размер легочного ствола (ЛС, мм); 2) пиковая скорость потока в легочном стволе (V_{max} ЛС, м/с); 3) систолическая экскурсия плоскости кольца трикуспидального клапана (TAPSE, мм); 4) фракция укорочения (ФУ, %) левого желудочка (ЛЖ).

3. *Катетеризация сердца с манометрией* давления в ПЖ выполнялась через 4 недели после

начала введения иЯК. В ходе проведения катетеризации сердца животные были наркотизированы ингаляцией изофлурана с помощью системы для газовой анестезии SomnoSuite Low-Flow Anesthesia System (*Kent Scientific*, США). Они были размещены на подогреваемом столике (TCAT-2LV controller, *Physitemp Instruments Inc.*, Clifton, NJ, USA) в положении на спине, искусственная вентиляция легких осуществлялась через интубацию трахеи с помощью аппарата искусственной вентиляции легких SAR – 830/AP (*CWE Inc.*, США). Были использованы следующие параметры искусственной вентиляции легких: частота дыхания – 60/мин, дыхательный объем – 3 мл/100 г массы тела. Измерение давления в ПЖ проводилось через пункцию верхушки ПЖ. Регистрация гемодинамических показателей (среднее давление в ПЖ (СрДПЖ), систолическое, диастолическое, среднее давление в ЛЖ) выполнялось с помощью программно-аппаратного комплекса «PhysExp Mini» (ООО «Кардиопротект», Россия). Для регистрации сердечного выброса (СВ) на восходящий отдел аорты устанавливался датчик объемного потока установки TS420 Perivascular Flow Module (*Transonic*, США).

4. *Гистологическое исследование* легких и сердца выполнялось через 4 недели после начала введения исследуемых субстанций. Для гистологической оценки легких была использована нижняя доля правого легкого. Доля разделялась на два поперечных уровня анализа. Срезы толщиной 3–5 мкм были окрашены гематоксилином и эозином. В качестве основного критерия оценки ремоделирования легочных артерий был использован индекс гипертрофии, рассчитанный как отношение площади сосудистой стенки к площади всего сосуда в процентах.

Исследование препаратов проводилось с помощью микроскопа Eclipse Ni-U (*Nikon*, Япония) при увеличении от $\times 5$ до $\times 40$. Результаты микроскопии оценивали с помощью программного обеспечения Nis Elements Br4 (*Nikon*, Япония).

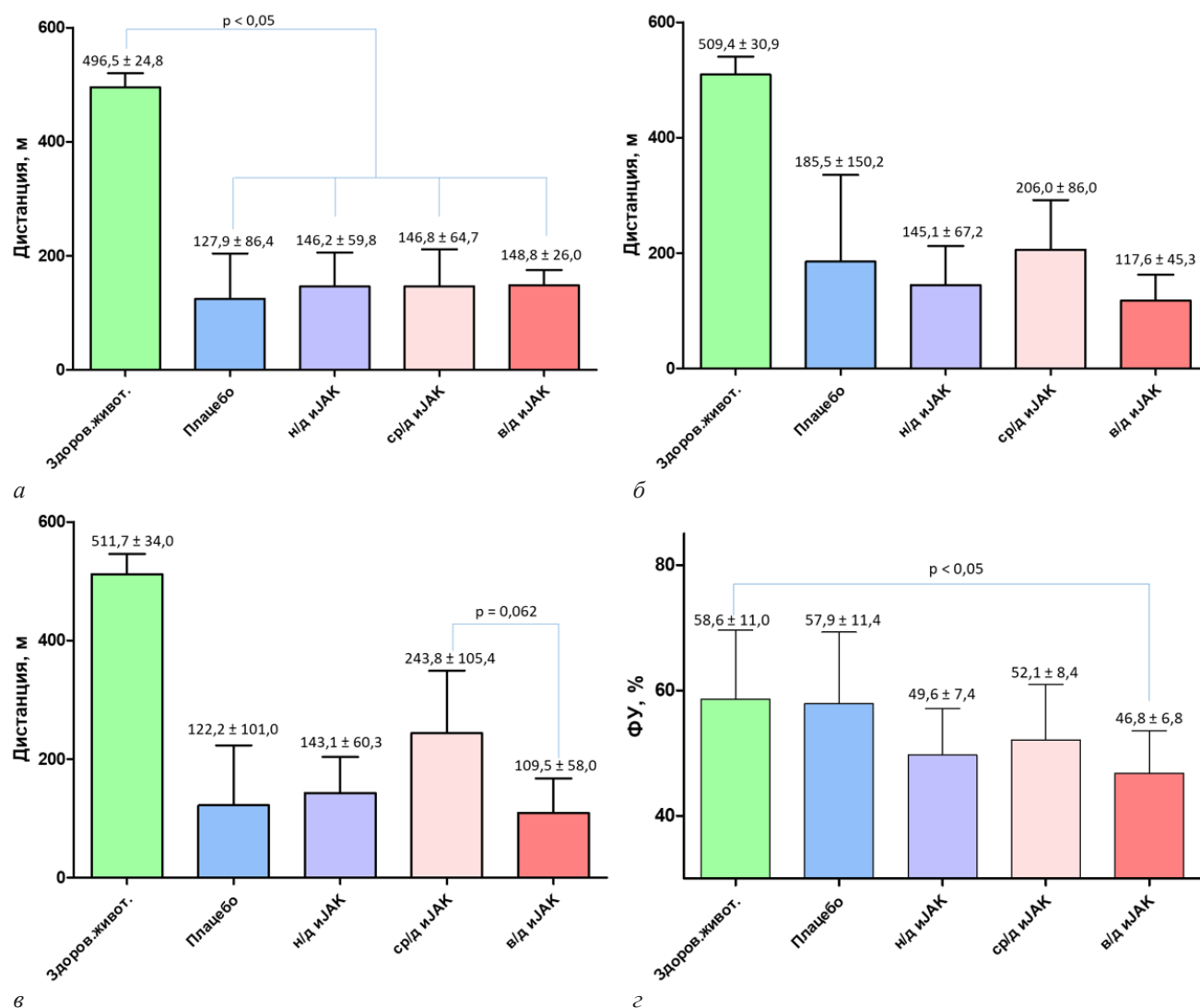


Рис. 3. Результаты неинвазивных тестов с использованием методик тредмил-теста (а–в) и эхокардиографии (г): а – оценка толерантности к физической нагрузке через 2 недели после последнего введения микросфер; б – через 2 недели после начала введения различных доз иJAK; в – через 4 недели после начала введения иJAK; г – фракция укорочения левого желудочка через 4 недели после начала введения исследуемой субстанции. Здоров. живот. – здоровые животные; иJAK – ингибитор янус-киназы; н/д – низкая доза; ср/д – средняя доза; в/д – высокая доза; ФУ – фракция укорочения

Fig. 3. Results of non-invasive tests using the methods: treadmill test (a–в) and echocardiography (г): а – assessment of exercise tolerance 2 weeks after the last injection of microspheres; б – 2 weeks after the start of the introduction of various doses of iJAK; в – 4 weeks after the start of iJAK administration; г – the shortening fraction of the left ventricle 4 weeks after the start of the administration of the test substance. Здоров. живот. – healthy animals; иJAK – Janus kinase inhibitor; н/д – low dose; ср/д – medium dose; в/д – high dose; ФУ – shortening fraction

Результаты эхокардиографического исследования через 4 недели после начала введения исследуемой субстанции

Results of echocardiographic examination 4 weeks after the start of administration of the substances under study

Параметр	Здоровые животные	Плацебо	н/д иJAK	ср/д иJAK	в/д иJAK
Диаметр ЛС, мм	2,87±0,23	2,98±0,28	2,88±0,26	3,14±0,4	2,96±0,24
Диаметр выносящего тракта ПЖ, мм	3,79±0,15	3,95±0,33	3,85±0,19	3,94±0,19	4,0±0,4
V _{max} в ЛС, см/с	346±58	313±41	331±39	340±26	335±40
V _{max} в выносящем тракте ПЖ, см/с	255±49	224±35	232±21	235±30	231±29
ЧСС, уд./мин	286±28	248±66	272±52	259±24	251±62
Фракция укорочения ЛЖ, %	59±11	58±11	50±7	52±9	47±7*
TAPSE, мм	2,34±0,39	2,11±0,63	2,22±0,58	2,06±0,37	2,42±0,73

Примечание: * – значимое ($p < 0,05$) различие по сравнению с группой здоровых животных; ЛЖ – левый желудочек; ЛС – легочный ствол; ПЖ – правый желудочек; ЧСС – частота сердечных сокращений; TAPSE – систолическая экскурсия плоскости кольца трикуспидального клапана; V_{max} – пиковая скорость потока; иJAK – ингибитор янус-киназы; н/д – низкая доза; ср/д – средняя доза; в/д – высокая доза.

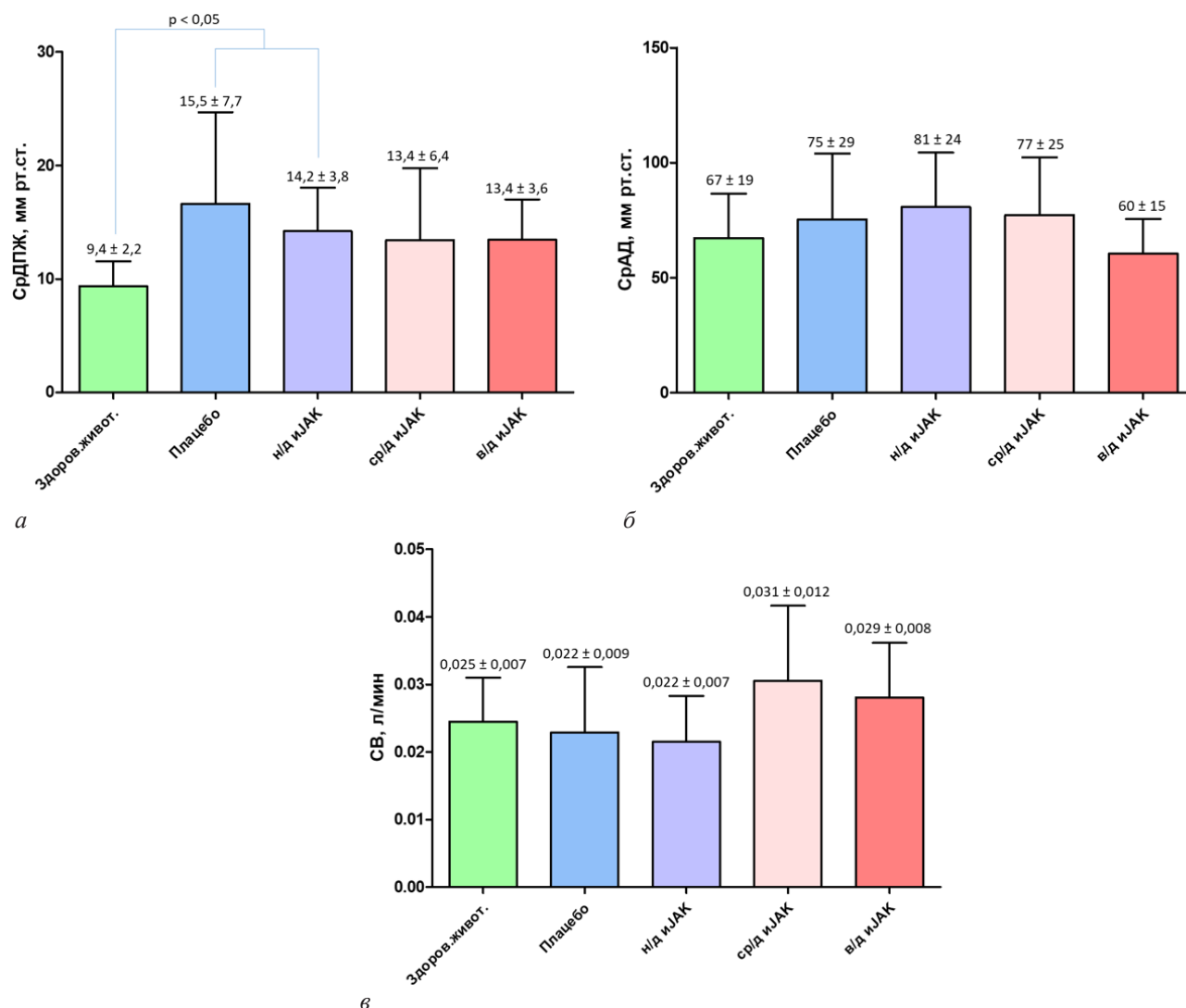


Рис. 4. Гемодинамические показатели через 4 недели после начала введения исследуемых субстанций по данным катетеризации сердца с манометрией: а – среднее давление в правом желудочке; б – среднее давление в левом желудочке; в – сердечный выброс. Здоров. живот. – здоровые животные, и/АК – ингибитор Янус-киназы, н/д – низкая доза, ср/д – средняя доза, в/д – высокая доза

Fig. 4. Hemodynamic parameters 4 weeks after the start of the administration of the test substances according to the data of cardiac catheterization with manometry: а – mean pressure in the right ventricle; б – mean pressure in the left ventricle; в – cardiac output. Здоров. живот. – healthy animals, и/АК – Janus kinase inhibitor, н/д – low dose, ср/д – medium dose, в/д – high dose, ФУ – shortening fraction

5. Анализ данных. Результаты представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение». Учитывая небольшой размер групп и отсутствие нормального распределения значений, для статистической обработки данных были применены методы непараметрической статистики, а именно: для оценки значимости различий между двумя несопряженными совокупностями применяли критерий Краскелла – Уоллиса.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью пакета прикладных программ «Statistica 10.0». Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

1. Потери экспериментальных животных. В период введения микросфер смертность животных составила 30 животных (48,4 % от исходного числа). Основными причинами гибели животных стали острая правожелудочковая сердечная недостаточность, парадоксальная эмболия с развитием острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК). В период введения и/АК гибели животных не было (рис. 2).

2. Тредмил-тест. По данным тредмил-теста через 2 недели после последнего введения МС, было продемонстрировано значимое ($p < 0,05$) снижение толерантности к физической нагрузке животных, перенесших эмболизацию сосудистого русла МКК, по сравнению со здоровыми животными. Все экспериментальные животные были разделены равномерно на 4 группы по результатам тредмил-теста (рис. 3, а). Через 2 недели после начала введения различных доз исследуемой субстанции значимых различий между экспериментальными группами обнаружено не было (рис. 3, б). Через 4 недели после начала введения исследуемой субстанции в группе применения ср/д и/АК отмечалась большая толерантность к физической нагрузке, по сравнению с применением в/д и/АК (рис. 3, в).

3. Эхокардиографическое исследование. По данным Эхо-КГ, отмечалось значимое снижение ФУ в группе в/д и/АК, по сравнению с группой здоровых животных (рис. 3, г). Других значимых различий между исследуемыми группами получено не было (таблица).

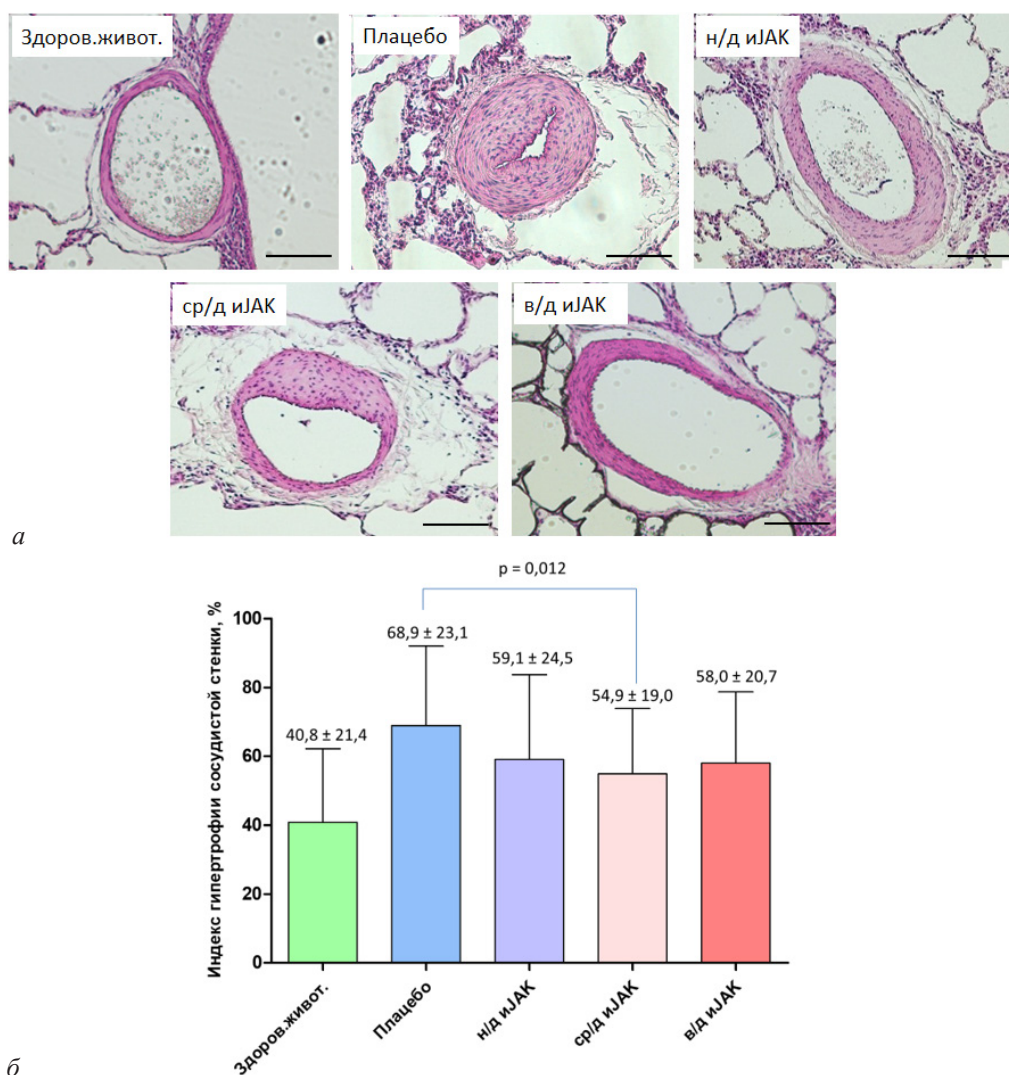


Рис. 5. Результаты гистологического исследования: а – репрезентативные микрофотографии ветвей легочной артерии исследуемых групп. Окраска: гематоксилин-эозин. Увеличение $\times 100$; б – индекс гипертрофии сосудистой стенки ветвей легочной артерии. Здоров. живот. – здоровые животные; иJAK – ингибитор Янус-киназы; н/д – низкая доза; ср/д – средняя доза; в/д – высокая доза; ФУ – фракция укорочения; S – площадь; ПЖ – правый желудочек; ЛЖ – левый желудочек

Fig. 5. Results of histological examination: а – representative microphotographs of the pulmonary artery branches of the studied groups. Stain: hematoxylin-eosin. Magnification $\times 100$; б – index of hypertrophy of the vascular wall of the branches of the pulmonary artery. Здоров. живот. – healthy animals; иJAK – Janus kinase inhibitor; н/д – low dose; ср/д – medium dose; в/д – high dose; ФУ – shortening fraction; S – area; ПЖ – right ventricle; ЛЖ – left ventricle

4. Катетеризация сердца с манометрией. По данным катетеризации сердца через 4 недели после начала курса введений исследуемой субстанции, в группах плацебо и н/д иJAK отмечалось значимое ($p < 0,05$) повышение среднего давления в ПЖ по сравнению со здоровыми животными. Значимых различий в уровне СВ и СрАД в ЛЖ между исследуемыми группами выявлено не было (рис. 4, б, в).

Гистологическое исследование. В ходе анализа было обработано 422 сосуда, относящихся к ветвям ЛА (рис. 5, а). Индекс гипертрофии сосудистой стенки был значимо выше во всех опытных группах по сравнению с группой здоровых животных ($p < 0,01$). Однако значимые различия между экспериментальными группами были выявлены только между группой применения ср/д иJAK и группой плацебо ($p = 0,012$) (рис. 5, б).

В результате проведенного исследования в группе плацебо отмечалось значимое снижение толерантности к физической нагрузке во всех точках наблю-

дения, повышение уровня СрДПЖ, а также редукция сосудистого русла и ремоделирование сосудистой стенки ветвей легочной артерии по сравнению со здоровыми животными. Таким образом, были достигнуты все основные изменения, характерные для ХТЭЛГ [17], что указывает на эффективность выбранного протокола моделирования.

Применение иJAK в этом исследовании оказало положительное воздействие как на ремоделирование, так и на гемодинамику малого круга кровообращения. Ранее иJAK не использовались для профилактики и лечения ХТЭЛГ, что затрудняет сравнение полученных данных с другими источниками. Однако, в недавно опубликованной статье D. Yerabolu et al. [11] экспериментально продемонстрирована роль JAK-STAT пути при формировании двух различных форм легочной гипертензии: индуцированной гипоксией на мышах и монокроталин-индуцированной на крысах. В этом исследовании руксолитиниб в обоих экспериментальных моделях снижал выраженность

легочной гипертензии и ремоделирования правого желудочка. Эти данные могут косвенно говорить о перспективности использования иЯК при различных формах легочной артериальной гипертензии. Интересные данные были получены и в комплексном биоинформационном анализе трех больших баз данных тканей легкого человека [18]. В результате математического моделирования и экспериментальной работы с культурой гладкомышечных клеток (ГМК) легочной артерии была продемонстрирована возможность руксолитиниба подавлять пролиферацию и миграцию ГМК сосудистой стенки, тем самым воздействуя на ремоделирование сосудистой стенки при легочной гипертензии. Более того, настоящее исследование экспериментально подтверждает многочисленные исследования, проведенные *in vitro*, раскрывающие спектр механизмов воздействия иЯК на процесс формирования фиброза и асептического воспаления разной локализации. В том числе была показана роль JAK-STAT пути в регуляции ИЛ-2, 4, 6, 12, 13, 17, 21, 23, 31 [19, 20], фактора роста фибробластов – 2 (FGF-2), [21], TGF- β [4, 5], PDGF [6]. Таким образом, основываясь на уже известных механизмах действия ингибиторов JAK 1,2, ключевым эффектом руксолитиниба в этом исследовании следует считать влияние на ремоделирование ветвей легочной артерии. Последующий молекулярный анализ полученного материала легочной ткани и сердца позволит уточнить это предположение.

В настоящем исследовании руксолитиниб проявил дозозависимый эффект на показатель толерантности к физической нагрузке, продемонстрировав максимальную эффективность в средней дозе иЯК (1,29 мг/кг·2 р./д.) и значимое снижение в группе применения высокой дозы иЯК (2,14 мг/кг·2 р./д.). Следует указать, что переносимость физической нагрузки является интегральным показателем состояния организма, на который влияют целый ряд факторов, таких как гемодинамика малого круга кровообращения, системная гемодинамика, наличие общей интоксикации. Значимое снижение толерантности к физической нагрузке в группе применения высокой дозы иЯК может быть напрямую связано со снижением систолической функции ЛЖ, выявленной по данным Эхо-КГ. Механизм этого снижения неизвестен, но нельзя исключить прямой кардиотоксический эффект высокой дозы препарата. При анализе литературных источников были найдены единичные описания кардиотоксичности руксолитиниба, зарегистрированные в клинической практике и сопровождавшиеся снижением систолической функции левого желудочка [22]. Таким образом, выявленное изменение фракции укорочения потребует дальнейшего изучения.

Заключение

В результате исследования была продемонстрирована дозозависимая способность руксолитиниба снижать выраженность ремоделирования МКК и повышать толерантность к физической нагрузке при формировании ХТЭЛГ в эксперименте на крысах. Продemonстрированные данные указывают на значимую роль асептического воспаления и опосредован-

ного им фиброза в формировании и прогрессировании ХТЭЛГ. Кроме того, применение класса препаратов – ингибиторов JAK – может быть использовано в комплексном лечении и профилактике ХТЭЛГ.

Конфликт интересов / Conflict of interest

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

Финансирование / Funding

Исследование выполнено при финансовой поддержке государственного задания № 122041800020-2 / The study was financially supported by state task No. 122041800020-2.

Литература / References

1. Grosse SD, Nelson RE, Nyarko KA, Richardson LC, Raskob GE. The economic burden of incident venous thromboembolism in the United States: A review of estimated attributable healthcare costs // *Thromb Res*. 2016;(137):3–10. Doi: 10.1016/j.thromres.2015.11.033.
2. Lang IM, Pesavento R, Bonderman D, Yuan JX. Risk factors and basic mechanisms of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a current understanding // *Eur Respir J*. 2013; 41(2):462–468. Doi: 10.1183/09031936.00049312.
3. Riedel M, Stanek V, Widimsky J, Prerovsky I. Longterm follow-up of patients with pulmonary thromboembolism. Late prognosis and evolution of hemodynamic and respiratory data // *Chest*. 1982;81(2):151–158. Doi: 10.1378/chest.81.2.151.
4. Haga S, Tsuchiya H, Hirai T, Hamano T, Mimori A, Ishizaka Y. A novel ACE2 activator reduces monocrotaline-induced pulmonary hypertension by suppressing the JAK/STAT and TGF-beta cascades with restored caveolin-1 expression // *Exp Lung Res*. 2015;41(1):21–31. Doi: 10.3109/01902148.2014.959141.
5. Dees C, Tomcik M, Palumbo-Zerr K, Distler A, Beyer C, Lang V, Horn A, Zerr P, Zwerina J, Gelse K, Distler O, Schett G, Distler JH. JAK-2 as a novel mediator of the profibrotic effects of transforming growth factor beta in systemic sclerosis // *Arthritis Rheum*. 2012;64(9):3006–3015. Doi: 10.1002/art.34500.
6. Yu Y, Sweeney M, Zhang S, Platoshyn O, Landsberg J, Rothman A, Yuan JX. PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression // *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;284(2):316–330. Doi: 10.1152/ajpcell.00125.2002.
7. Matsui F, Meldrum KK. The role of the Janus kinase family/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in fibrotic renal disease // *J Surg Res*. 2012; 178(1):339–345. Doi: 10.1016/j.jss.2012.06.050.
8. Solary E. Unplugging JAK/STAT in Chronic Myelomonocytic Leukemia // *Clin Cancer Res*. 2016;22(15):3707–3709. Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0372.
9. Zeiser R, Burchert A, Lengerke C, Verbeek M, Maas-Bauer K, Metzelder SK, Spoerl S, Ditschkowski M, Ecsedi M, Sockel K, Ayuk F, Ajib S, de Fontbrune FS, Na IK, Penter L, Holtick U, Wolf D, Schuler E, Meyer E, Apostolova P, Bertz H, Marks R, Lubbert M, Wasch R, Scheid C, Stolz F, Ordemann R, Bug G, Kobbe G, Negrin R, Brune M, Spyridonidis A, Schmitt-Graff A, van der Velden W, Huls G, Mielke S, Grigoleit GU, Kuball J, Flynn R, Ihorst G, Du J, Blazar BR, Arnold R, Kroger N, Passweg J, Halter J, Socie G, Beelen D, Peschel C, Neubauer A, Finke J, Duyster J, von Bubnoff N. Ruxolitinib in corticosteroid-refractory graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: a multicenter survey // *Leukemia*. 2015;29(10):2062–2068. Doi: 10.1038/leu.2015.212.

10. Banerjee S, Biehl A, Gadina M, Hasni S, Schwartz DM. JAK-STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects // *Drugs*. 2017; 77(5): 521–546. Doi: 10.1007/s40265-017-0701-9.
11. Yerabolu D, Weiss A, Kojonazarov B, Boehm M, Schluter BC, Ruppert C, Gunther A, Jonigk D, Grimminger F, Gho-frani HA, Seeger W, Weissmann N, Schermuly RT. Targeting Jak-Stat Signaling in Experimental Pulmonary Hypertension // *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2021;64(1):100–114. Doi: 10.1165/rcmb.2019-0431OC.
12. Leopold JA. Inhibiting Jak2 Ameliorates Pulmonary Hypertension: Fulfilling the Promise of Precision Medicine // *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2021;64(1):12–13. Doi: 10.1165/rcmb.2020-0384ED.
13. Karpov AA, Anikin NA, Mihailova AM, Smirnov SS, Vaulina DD, Shilenko LA, Ivkin DY, Bagrov AY, Moiseeva OM, Galagudza MM. Model of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension in Rats Caused by Repeated Intravenous Administration of Partially Biodegradable Sodium Alginate Microspheres // *Int J Mol Sci*. 2021;22(3). Doi: 10.3390/ijms22031149.
14. Карпов А. А., Аникин Н. А., Черепанов Д. Е. и др. Модель хронической тромбоземболической легочной гипертензии у крыс, вызванная повторным внутривенным введением биodeградируемых микросфер из альгината натрия // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. – 2019. – № 18(1). – С. 86–95. [Karpov AA, Anikin NA, Cherepanov DE, Mikhailova AM, Krasnova MV, Smirnov SS, Bunenkov NS, Chifu SG, Ivkin DY, Moiseeva OM, Galagudza MM. Model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension in rats, caused by repeated intravenous administration of biodegradable microspheres from sodium alginate. Regional blood circulation and microcirculation. 2019;18(1):86–95. (In Russ.)]. Doi: 10.24884/1682-6655-2019-18-1-86-95.
15. Freireich EJ, Gehan EA, Rall DP, Schmidt LH, Skipper HE. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man // *Cancer Chemother Rep*. 1966;50(4):219–244.
16. El-Kady MM, Naggar RA, Guimei M, Talaat IM, Shaker OG, Saber-Ayad M. Early Renoprotective Effect of Ruxolitinib in a Rat Model of Diabetic Nephropathy // *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(7):608. Doi: 10.3390/ph14070608.
17. Chong CZ, Tay ELW, Sia CH, Poh KK. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a review // *Singapore Med J*. 2021;62(7):318–325. Doi: 10.11622/smedj.2021089.
18. Dong H, Li X, Cai M, Zhang C, Mao W, Wang Y, Xu Q, Chen M, Wang L, Huang X. Integrated bioinformatic analysis reveals the underlying molecular mechanism of and potential drugs for pulmonary arterial hypertension // *Aging (Albany NY)*. 2021;13(10):14234–14257. Doi: 10.18632/aging.203040.
19. Floss DM, Klöcker T, Schröder J, Lamertz L, Mrotzek S, Strobl B, Hermanns H, Scheller J. Defining the functional binding sites of interleukin 12 receptor $\beta 1$ and interleukin 23 receptor to Janus kinases // *Mol Biol Cell*. 2016;27(14):2301–2316. Doi: 10.1091/mbc.E14-12-1645.
20. Gonzales AJ, Bowman JW, Fici GJ, Zhang M, Mann DW, Mitton-Fry M. Oclacitinib (APOQUEL®) is a novel Janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy // *J Vet Pharmacol Ther*. 2014;37(4):317–324. Doi: 10.1111/jvp.12101.
21. Carmo CR, Lyons-Lewis J, Seckl MJ, Costa-Pereira AP. A novel requirement for Janus kinases as mediators of drug resistance induced by fibroblast growth factor-2 in human cancer cells // *PLoS One*. 2011;6(5):e19861. Doi: 10.1371/journal.pone.0019861.
22. Miyawaki H, Kioka H, Sato K, Kurashige M, Ozawa T, Shibayama H, Hikoso S, Morii E, Yamauchi-Takahara K, Sakata Y. Long-term Effects of the Janus Kinase 1/2 Inhibitor Ruxolitinib on Pulmonary Hypertension and the Cardiac Function in a Patient with Myelofibrosis // *Intern Med*. 2020;59(2):229–233. Doi: 10.2169/internalmedicine.3528-19.

Информация об авторах

Карпов Андрей Александрович – канд. мед. наук, зав. НИЛ патологии малого круга кровообращения, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: Karpov_AA@almazovcentre.ru.

Ваулина Дария Дмитриевна – младший научный сотрудник НИЛ патологии малого круга кровообращения, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: uplavice@gmail.com.

Михайлова Александра Михайловна – младший научный сотрудник НИЛ патологии малого круга кровообращения, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: aechika82@mail.ru.

Смирнов Сергей Сергеевич – лаборант-исследователь НИЛ патологии малого круга кровообращения, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия, ординатор 2-го года обучения, ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: saveliy.morozov.93@mail.ru

Шиленко Леонид Алексеевич – лаборант-исследователь НИЛ патологии малого круга кровообращения, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия, студент, ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: Leonidmed99@gmail.com.

Аникин Никита Алексеевич – младший научный сотрудник НИЛ патологии малого круга кровообращения, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: freedomofstyle@yandex.ru

Чепурной Захар Ильич – лаборант-исследователь НИЛ патологии малого круга кровообращения, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия, студент, ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: zakhar96psk@mail.ru.

Воротиллов Александр Владимирович – ординатор 1-го года обучения, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: allegoriarus@gmail.com

Стафеева Анна Германовна – студент, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: stafeeva.anna2017@yandex.ru

Буненков Николай Сергеевич – канд. мед. наук, врач, ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, младший научный сотрудник НИЛ Патологии малого круга кровообращения, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: bunenkov2006@gmail.com.

Ивкин Дмитрий Юрьевич – канд. биол. наук, директор Центра экспериментальной фармакологии, Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: ivkin.mail.ru@mail.ru.

Галагудза Михаил Михайлович – д-р мед. наук, профессор и член-корр. РАН, директор Института экспериментальной медицины, профессор кафедры патофизиологии с курсом клинической патофизиологии, ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: galagudza@almazovcentre.ru.

Authors information

Karpov Andrei A. – PhD, MD, Chief of the Laboratory of Pulmonary Vascular Disease, Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia, e-mail: Karpov_AA@almazovcentre.ru.

Vaulina Dariya D. – Junior researcher of the Laboratory of Pulmonary Vascular Disease, Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia, e-mail: uplavice@gmail.com.

Mikhailova Alexandra M. – Junior researcher of the Laboratory of Pulmonary Vascular Disease, Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia, e-mail: aechika82@mail.ru.

Smirnov Sergey S. – research laboratory assistant of the Laboratory of Pulmonary Vascular Disease, Almazov National Medical Research Centre, clinical resident 1 year of study of the Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: saveliy.morozov.93@mail.ru

Shilenko Leonid A. – research laboratory assistant of the Laboratory of Pulmonary Vascular Disease, Almazov National Medical Research Centre, student of the Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: Leonidmed99@gmail.com.

Anikin Nikita A. – Junior researcher of the Laboratory of Pulmonary Vascular Disease, Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia, e-mail: freedomofstyle@yandex.ru.

Chepurnoy Zakhar I. – research laboratory assistant of the Laboratory of Pulmonary Vascular Disease, Almazov National Medical Research Centre, student of the Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: zakhar96psk@mail.ru.

Vorotilov Alexander V. – clinical resident 1 year of study Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia, e-mail: allegoriarus@gmail.com.

Stafeeva Anna G. – student of the Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia, e-mail: stafeeva.anna2017@yandex.ru.

Bunenkov Nikolay S. – PhD, MD, doctor of the Pavlov University, Junior researcher of the Laboratory of Pulmonary Vascular Disease, Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia, e-mail: bunenkov2006@gmail.com.

Ivkin Dmitry Y. – PhD, Director of the Center for Experimental Pharmacology of the Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: ivkin.mail.ru@mail.ru.

Galagudza Michael M. – MD, Dr. Med. Sci., Professor and Corresponding Member of the Russian Academy of Science, Director of the Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre; Professor at the Department of Pathophysiology, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: galagoudza@mail.ru.