

КЛЕТОЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТОКСИЧЕСКОГО ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ КРЫС В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИЙ ЕГО РАЗВИТИЯ

DOI: 10.17691/stm2023.15.4.05

УДК 616.36-004-02:615.9

Поступила 29.04.2023 г.

**Е.И. Лебедева**, к.б.н., доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии¹;**А.Т. Щастный**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой госпитальной хирургии с курсом ФПК и ПК¹;**А.С. Бабенко**, к.х.н., доцент кафедры биоорганической химии²¹Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, проспект Фрунзе, 27, Витебск, 210009, Республика Беларусь;²Белорусский государственный медицинский университет, проспект Дзержинского, 83, корп. 15, Минск, 220116, Республика Беларусь

Цель исследования — изучить клеточно-молекулярные особенности токсического фиброза печени крыс в зависимости от стадий развития этого патологического состояния.

Материалы и методы. Фиброгенез печени у крыс-самцов линии Wistar индуцировали раствором тиаоацетида путем введения в желудок с помощью зонда в дозе 200 мг/кг массы тела животного 2 раза в неделю. Динамику процесса изучали в 5 временных точках (контроль, 3, 5, 7 и 9 нед). Уровень мРНК генов *tweak*, *fn14*, *ang*, *vegfa*, *cxcl12*, *mmp-9* в печени выявляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах. В качестве маркеров использовали клетки CD31, CD34, CK19, α -SMA, FAP, CD68, CD206, CX3CR1, CD45. Степень фиброза определяли в гистологических срезах, окрашенных по методу Маллори, согласно полуколичественной шкале K.G. Ishak.

Результаты. В печени крыс одновременно выявили две морфологически неоднородные популяции миофибробластов, экспрессирующие различные типы маркеров (FAP, α -SMA). До начала процесса трансформации фиброза в цирроз (F1–F4, 3–7 нед) клетки FAP⁺ и SMA⁺ локализовались в разных местах гистологических препаратов. Все стадии прогрессирования фиброза печени сопровождались увеличением количества ($p=0,0000$), изменением фенотипического состава и функциональных свойств макрофагов. Клетки CK19⁺ портальных зон дифференцировались в холангиоциты, формирующие междольковые желчные протоки и протоки, а также гепатоциты, формирующие зачатки новых печеночных микродолек. Установлены патологический венозный ангиогенез и гетерогенность эндотелиоцитов внутрипеченочного сосудистого русла. Определены два варианта изменения экспрессии мРНК выбранных генов. Уровень мРНК *fn14* и *mmp-9* на всех стадиях фиброза был выше ($p=0,0000$), чем у крыс контрольной группы. В отношении мРНК *tweak*, *ang*, *vegfa*, *cxcl12* ситуация была противоположной — уровень генов упал ($p=0,0000$). Между исследуемыми генами-мишенями отмечены сильные и умеренные корреляции ($p<0,05$).

Заключение. Установлено, что стадии токсического фиброза имеют морфологические и молекулярно-генетические особенности. Клетки FAP⁺ вносят основной вклад в развитие портального и начального этапа мостовидного фиброза. В перспективе звездчатые макрофаги и инфильтрирующие моноциты/макрофаги могут быть использованы при разработке новых терапевтических стратегий для лечения патологии печени. При исследовании внутрипеченочного сосудистого русла необходимо учитывать особенности экспрессии маркеров эндотелиоцитами. Совместное относительно друг друга изучение генов является необходимым дополнительным параметром при проведении фундаментальных и доклинических исследований.

Ключевые слова: фиброгенез печени крыс; токсический фиброз; экспрессия мРНК; иммуногистохимия; шкала K.G. Ishak.

Как цитировать: Lebedeva E.I., Shchastniy A.T., Babenka A.S. Cellular and molecular mechanisms of toxic liver fibrosis in rats depending on the stages of its development. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2023; 15(4): 50, <https://doi.org/10.17691/stm2023.15.4.05>

English

Cellular and Molecular Mechanisms of Toxic Liver Fibrosis in Rats Depending on the Stages of Its Development

E.I. Lebedeva, PhD, Associate Professor, Department of Histology, Cytology and Embryology¹;**A.T. Shchastniy**, MD, DSc, Professor, Head of the Department of Hospital Surgery with the Course of the Fetoplacental Complex and Placental Complex¹;

Для контактов: Лебедева Елена Ивановна, e-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.by

A.S. Babenka, PhD, Associate Professor, Department of Bioorganic Chemistry²

¹Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, 27 Frunze Avenue, Vitebsk, 210009, the Republic of Belarus;

²Belarusian State Medical University, 83 Dzerzhinsky Avenue, Minsk, 220116, the Republic of Belarus

The aim is to study the cellular and molecular features of toxic liver fibrosis in rats and its dependence on development stages of this pathological condition.

Materials and Methods. Liver fibrogenesis in male Wistar rats was induced with the thioacetamide solution by introducing into the stomach with a probe at a dose of 200 mg/kg of animal body weight 2 times per week. The process dynamics was studied at 5 time points (control, week 3, week 5, week 7, and week 9). The mRNA levels of *tweak*, *fn14*, *ang*, *vegfa*, *cxcl12*, and *mmp-9* genes in liver were detected by real-time polymerase chain reaction. Immunohistochemical study was performed on paraffin sections. The CD31, CD34, CK19, α -SMA, FAP, CD68, CD206, CX3CR1, and CD45 cells were used as markers. Fibrosis degree was determined in histological sections, stained in line with the Mallory technique, according to the Ishak's semi-quantitative scale.

Results. Two simultaneously existing morphologically heterogeneous populations of myofibroblasts expressing different types of markers (FAP, α -SMA) were identified in rat liver. Prior to the onset of transformation of fibrosis into cirrhosis (F1–F4, weeks 3–7), FAP⁺ and SMA⁺ cells were localized in different places on histological specimens. All stages of liver fibrosis development were accompanied by an increase in the number ($p=0.0000$), a change in the phenotypic structure and functional properties of macrophages. The CK19⁺ cells of the portal areas differentiated into cholangiocytes that formed interlobular bile ducts and ductules, as well as hepatocytes that formed rudiments of new hepatic microlobules. Pathological venous angiogenesis and heterogeneity of endotheliocytes of the intrahepatic vascular bed were detected. Two options for changes in mRNA expression of the selected genes were identified. The level of the *fn14* and *mmp-9* mRNAs at all stages of fibrosis was higher ($p=0.0000$) than in control rats. For *tweak*, *ang*, *vegfa*, and *cxcl12* mRNAs, the situation was the opposite — the level of genes decreased ($p=0.0000$). There were strong and moderate correlations between the studied target genes ($p<0.05$).

Conclusion. It was established that the stages of toxic fibrosis had morphological and molecular genetic features. The FAP⁺ cells make the main contribution to development of portal and initial stage of bridging fibrosis. The stellate macrophages and infiltrating monocytes/macrophages can potentially be used for development of new therapeutic strategies for liver pathology treatment. One should take into account the features of the markers' expression by endothelial cells during the study of the intrahepatic vascular bed. Joint study of genes is a necessary *ad-hoc* parameter in fundamental and preclinical research.

Key words: rat liver fibrogenesis; toxic fibrosis; mRNA expression; immunohistochemistry; Ishak's scale.

Введение

От хронических заболеваний печени различной этиологии ежегодно умирает около 2 млн жителей планеты [1, 2]. К настоящему времени накоплено немало сведений о клеточно-молекулярных механизмах, приводящих к фиброзу и циррозу печени, предложены потенциальные стратегии лечения данных патологических процессов, однако до сих пор не существует эффективной антифибротической терапии [3–9]. Исследование клеточно-молекулярных закономерностей требует рассмотрения значительного количества факторов на разных уровнях организации одновременно с анализом генетической информации, во-первых, на уровне белков, мРНК и собственно ДНК, во-вторых, на уровне регуляции процессов транскрипции и трансляции с вовлечением малых и длинных некодирующих РНК, а также процессов, использующих модификацию структуры мРНК и ДНК [7, 10].

Морфологически фиброз печени проявляется нарушением пластинчатого строения паренхимы, активацией и трансдифференцировкой (изменением фенотипического профиля) ряда клеток, развитием воспаления, патологическим ангиогенезом и разрастанием фиброзной соединительной ткани [8, 11–14]. В связи с этим представляется логичным проведение исследований, направленных на изучение потенци-

альных клеток и генов-мишеней, отвечающих за эти патологические процессы на тканевом, клеточном и молекулярном уровнях. Однако в силу ряда причин (технических, финансовых, этических и других) при изучении клеточно-молекулярных механизмов фиброза большинство авторов детально и глубоко не рассматривают фиброгенез и не учитывают его ключевые точки, такие как инициация и переход из стадии фиброза в цирроз. Вследствие этого значительная часть информации теряется [2, 11, 12].

В данной работе выбор клеточных популяций и генов-мишеней был привязан к стадиям фиброза до начала его перехода в цирроз. Учитывались такие параметры, как наличие или отсутствие воспаления, патологический ангиогенез и разрастание фиброзной соединительной ткани. На основании данных литературы нами были выбраны 6 генов-мишеней: *tweak* (*tnfsf12*), *fn14* (*tnfrsf12a*), *ang*, *vegfa*, *cxcl12* (*sdf*) и *mmp-9*, вовлекаемых в молекулярные каскады, связанные с указанными выше параметрами [15–20]. До сих пор неизвестно, участвуют ли продукты этих генов в процессах инициации и развития фиброза отдельно, в рамках соответствующих сигнальных путей, или тесно переплетаются для реализации своих функций и являются элементами единого процесса.

Прогрессирование и разрешение фиброза протекают с участием паренхиматозных и непаренхиматозных клеток печени и инфильтрирующих орган клеток.

Существуют противоречия в отношении функций этих клеток, изменения их количества, фенотипа, а также локализации фиброгенной популяции клеток и различных субпопуляций макрофагов (тканевых звездчатых макрофагов: M1, M2a, M2b, M2c и инфильтрирующих макрофагов, а также фиброгенной популяции клеток) [21–27]. Вероятно, использование разных экспериментальных моделей и методов исследований и обуславливает отличия в интерпретации полученных результатов.

Исходя из вышеуказанного, можно предположить, что инициация и развитие фиброза печени токсической этиологии сопровождаются изменениями уровня экспрессии выбранных молекулярных мишеней, а также сменой фенотипического профиля клеток.

Цель исследования — изучить клеточно-молекулярные особенности токсического фиброза печени крыс в зависимости от стадий развития этого патологического состояния.

Материалы и методы

В рамках данной работы применяли международные термины по цитологии и гистологии [28], а при описании генов-мишеней — названия терминов, принятые в Guidelines for Nomenclature of Genes, Genetic Markers, Alleles, and Mutations in Mouse and Rat (<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>).

Клетки печени. Для настоящего исследования были выбраны жиронакапливающие клетки (звездчатые клетки печени, липоциты, перисинусоидные клетки, клетки Ито, перициты, stellatные клетки) и портальные фибробласты — как основные источники межклеточного вещества; три субпопуляции макрофагов (тканевые, костномозгового происхождения, активированные по альтернативному противовоспалительному M2-фенотипу); бипотентные стволовые клетки печени и эндотелиоциты.

Экспериментальная модель. В работе использовали крыс-самцов линии Wistar массой 190–210 г. Исследование одобрено комиссией по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными Витебского государственного ордена Дружбы народов медицинского университета (протокол №6 от 03.01.2019 г.). Исследование проводили в соответствии с этическими принципами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006). Животных содержали в пластиково-металлических клетках, по 6 особей в каждой, при естественном освещении и со свободным доступом к корму и воде. Температуру в помещении вивария поддерживали на уровне 21–23°C, влажность воздуха составляла около 50%.

Фиброз печени моделировали путем хронической интоксикации тиаоацетамидом (ТАА; Acros Organics, Бельгия). У лабораторных животных ТАА вызывает поражение печени с морфологическими характери-

стиками, аналогичными таковым у людей с фиброзом и циррозом печени [29]. Свежеприготовленный раствор ТАА вводили интрагастрально через зонд в дозе 200 мг/кг массы тела 2 раза в неделю. Животных рандомизировали на 4 группы (n=12 в каждой) в зависимости от длительности воздействия ТАА: 3 нед (1-я группа), 5 нед (2-я группа), 7 нед (3-я группа), 9 нед (4-я группа). Крысы контрольной группы (n=12) получали воду без ТАА в аналогичном объеме интрагастрально с помощью зонда.

Гистологическое, иммуногистохимическое и морфометрическое исследования. После декапитации под кратковременным эфирным наркозом с применением гильотины из большой левой доли печени крыс забирали образцы диаметром 5–10 мм, которые помещали в 10% раствор нейтрального формалина («Биовитрум», Россия) на фосфатном буфере и фиксировали в течение 24 ч. От каждого животного получали по одному блоку для каждого метода окрашивания и с помощью микротомы HM340E (MICROM Laborgeräte GmbH, Германия) готовили в среднем по 3–4 среза толщиной 4 мкм и помещали их на предметные стекла. Для получения обзорных гистологических препаратов срезы печени окрашивали гематоксилином и эозином, а для выявления соединительной ткани — по Маллори с помощью автомата для окраски HMS70 (Thermo Fisher Scientific, Германия). Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах [30]. Список маркеров представлен в табл. 1.

В работе применяли антитела производства Wuhan Elabscience Biotechnology Co., Ltd (Китай), набор 2-step plus Poly-HRP Anti Rabbit/Mouse IgG Detection System/with DAB Solution; Retrieve-All Antigen (Unmasking System Basic) и буфер для разведения антител (BioLegend Inc, США); Твин-20 (Glentham Life Sciences, Великобритания); PBS (Melford, Великобритания). Для лучшей ориентации в препарате и правильной идентификации клеток, содержащих искомым антиген, срезы докрасивали гематоксилином Майера в течение 1 мин. С целью объективной интерпретации результатов для каждой исследуемой серии (группы животных) использовали положительный и отрицательный контроль. Иммуногистохимическую окраску оценивали как положительную только при отсутствии окрашивания в отрицательном контроле и, наоборот, как отрицательную — при отсутствии окрашивания в положительном контроле.

Гистологические препараты исследовали с использованием компьютерных программ ImageScope Color и Olympus cellSens Standard. Определяли площадь соединительной ткани и площадь экспрессии маркеров CD31, CD34, CK19 в процентах к площади изображения без учета степени экспрессии маркеров [31]. Измерения осуществляли путем микрофотосъемки случайных полей зрения препаратов цифровой камерой Olympus XC30 (Япония) на базе микроскопа Olympus BX51 (Япония). Количество клеток α -SMA⁺,

FAP⁺, CD68⁺, CD206⁺, CX3CR1⁺ и CD45⁺ подсчитывали в 12 полях зрения каждого гистологического среза при увеличении объектива 40×. Измеряли площадь междольковых вен в мкм². Степень фиброза определяли с использованием полуколичественной шкалы K.G. Ishak [32].

Оценка уровня мРНК *tweak*, *fn14*, *ang*, *vegfa*, *cxcl12*, *timp-9*. Фрагменты печени диаметром не более 5 мм помещали в криобирки и далее в жидкий азот для хранения до начала процедуры выделения суммарной РНК. Общую фракцию РНК определяли с помощью набора «АртРНК MiniSpin» («АртБиоТех», Беларусь) согласно инструкции производителя. Для синтеза кДНК применяли олиго(dT)-праймеры и набор реагентов ArtMMLV Total («АртБиоТех», Беларусь) в соответствии с инструкцией производителя. Для каждой реакции использовали 200 нг общей фракции РНК. Выбор олигонуклеотидных праймеров и зондов для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) осуществляли с помощью бесплатного онлайн-приложения Primer3 v. 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Перечень выбранных молекулярных мишеней, референсный ген и

последовательности олигонуклеотидных праймеров представлены в табл. 2 и 3.

Использовали метод ПЦР-РВ с реагентами производства компании «Праймтех» (Беларусь). Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл и содержал все необходимые компоненты в следующих концентрациях: 2 мМ хлорида магния, 0,1 мМ смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов, 500 нМ олигонуклеотидов, включая зонд для ПЦР-РВ, 1,25 ед. термостабильной Taq ДНК-полимеразы с соответствующим буферным раствором. Режим термоциклирования: +95°C — 2 мин, затем 40 циклов: +95°C — 5 с, +60°C — 45 с. Детекцию по каналу FAM проводили после каждого цикла с помощью прибора CFX96 touch (Bio-Rad, США). Эффективность реакций определяли с помощью метода стандартной кривой и серий разведений, концентрированных образцов кДНК. Для каждого образца биологического материала ПЦР-РВ проводили в трех повторах. В каждой экспериментальной и контрольной группах все 12 образцов анализировали отдельно для получения наибольшей достоверности и учета внутригрупповой вариации, а также фенотипической гетерогенности уровня экспрессии генов.

Таблица 1

Список маркеров, использованных в работе

Название маркера	Маркер	Каталожный номер	Разведение
Моноклональные мышиные антитела CD31	Эндотелиальных клеток	E-AB-70173	1:500
Поликлональные мышиные антитела CD34	Мезенхимальных стволовых/предшественников эндотелиальных клеток/эндотелиальных клеток	E-AB-60105	1:100
Моноклональные мышиные антитела α-SMA	Активированных жиронакапливающих клеток	E-AB-22155	1:1000
Поликлональные кроличьи антитела FAP	Активированных порталных фибробластов	E-AB-32870	1:100
Моноклональные мышиные антитела CD68	Тканевых макрофагов	E-AB-22013	1:200
Поликлональные кроличьи антитела CD206	Функционального состояния тканевых макрофагов	E-AB-70178	1:500
Поликлональные кроличьи антитела CX3CR1	Макрофагов костномозгового происхождения	E-AB-33382	1:100
Моноклональные мышиные антитела CK19	Билиарных стволовых клеток печени	E-AB-70231	1:1000
Поликлональные кроличьи антитела CD45	Гемопозитических стволовых клеток	E-AB-16319	1:200

Таблица 2

Характеристика генов-мишеней и референсного гена, используемых в исследовании

Название гена	Статус	Идентификатор гена в базе NCBI (Gene ID)	Референсная последовательность мРНК	Кодируемый белок
<i>tweak</i>	Мишень	360548	NM_001001513.2	Член суперсемейства фактора некроза опухоли 12
<i>fn14</i>	Мишень	302965	NM_181086.3	Член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей 12A
<i>ang</i>	Мишень	305843	NM_001006992.1	Ангиогенин
<i>vegfa</i>	Мишень	83785	NM_031836.3	Фактор роста эндотелия сосудов A
<i>cxcl12</i>	Мишень	24772	NM_001033883.1	Хемокин подсемейства CXC
<i>timp-9</i>	Мишень	81687	NM_031055.2	Матриксная протеиназа 9
<i>hes1*</i>	Кандидат в референсные гены	29577	NM_024360.4	Фактор транскрипции 1 семейства bHLH

* ген *hes1* использован в качестве референсного гена, поскольку в предварительных экспериментах показал высокий уровень стабильности экспрессии; первоначально рассматривался как ген-мишень [33].

Таблица 3

Последовательности специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов генов-мишеней и референсного гена

Название гена	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	Модификация 5'/3'
<i>tweak</i> (прямой)	CCCATTATGAGGTTTCATCCAC	
<i>tweak</i> (обратный)	TCTCTTCCCAGCCACTCACT	
<i>tweak</i> (зонд)	GACAGGATGGAGCACAGGCA	FAM/BHQ1
<i>fn14</i> (прямой)	GGATGCGCAGCAGCAC	
<i>fn14</i> (обратный)	CAAAACCAGGGCCAGACTAA	
<i>fn14</i> (зонд)	CCTGCCACTTCAGGATGCT	FAM/BHQ1
<i>ang</i> (прямой)	TGCGAAAGTATGATGAGGAGAA	
<i>ang</i> (обратный)	TGTTGCCATGGATAAAGGTG	
<i>ang</i> (зонд)	ACCTCGCCCTGCAAAGAGGT	FAM/BHQ1
<i>vegfa</i> (прямой)	GCAGATCATGCGGATCAA	
<i>vegfa</i> (обратный)	ATGCTGCAGGAAGCTCATCT	
<i>vegfa</i> (зонд)	CCTCACAAAGCCAGCACAT	FAM/BHQ1
<i>cxcl12</i> (прямой)	CAGATTGTTGCAAGGCTGAA	
<i>cxcl12</i> (обратный)	TCCACTTTAATTTCCGGTCAA	
<i>cxcl12</i> (зонд)	AAGCAACAACAGACAAGTGTGCA	FAM/BHQ1
<i>mmp-9</i> (прямой)	CTACTCGAGCCGACGTCAC	
<i>mmp-9</i> (обратный)	AGAGTACTGCTTGCCAGGA	
<i>mmp-9</i> (зонд)	GATGTGCGTCTTCCCCTTCG	FAM/BHQ1
<i>hes1</i> (прямой)	GAAAGATAGCTCCCGGCATT	
<i>hes1</i> (обратный)	CGGAGGTGCTTCACTGTCAT	
<i>hes1</i> (зонд)	CCAAGCTGGAGAAGGCAGACA	FAM/BHQ1

Эффективность реакций, а также абсолютное число копий, соответствующих мПНК, оценивали методом стандартной кривой. Относительный уровень экспрессии мПНК определяли с помощью метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Эффективность всех реакций варьировала менее чем на 5% и составила 94–97%.

Статистический анализ. Результаты количественных измерений оценивали с использованием программ Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.), Microsoft Office Excel (Microsoft Corp.). Для каждой выборки определяли нормальность частотного распределения каждого признака. Выборки не являлись малыми ($n=60>50$), поэтому проверку осуществляли по критерию Лиллиефорса. Данные представляли в виде средних арифметических (M) и их соответствующих доверительных интервалов (95% CI), медианы и значения 15-го и 85-го процентилей (Me [15%; 85%]). Об уровне статистической значимости различий изучаемых признаков в группах с нормальным распределением данных судили по t -критерию Стьюдента; в случае отличия выборок от нормального распределения использовали U -критерий Манна–Уитни. Для выявления наличия зависимости и ее силы между изучаемыми признаками использовали непараметрическую ранговую корреляцию Спирмена и параметрическую корреляцию Пирсона. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

Результаты

Патоморфологическая характеристика печени крыс в ходе эксперимента. По истечении трех недель эксперимента пластинчатое строение долек печени преимущественно было сохранено, но в отдельных участках паренхимы встречались островки из 10–15 гепатоцитов в состоянии некробиоза. Местами наблюдали единично локализованные печеночные клетки с плазмолизом, кариолизисом и развитием перинуклеарного отека (рис. 1, а). По периферии классических печеночных долек отмечали бесформенные, набухшие гепатоциты. Границы между ними были неотчетливые и часто не различались. В большинстве полей зрения выявили утолщение грубоволокнистой соединительной ткани вокруг портальных зон и реже — у центральных вен (портальный и централобулярный фиброз, рис. 1, б). Встречались неполные соединительнотканые септы, формирующиеся у портальных зон, которые слепо заканчивались в паренхиме. Степень фиброза оценили как F1.

При дальнейшей интоксикации крыс (через 5 и 7 нед) выявили обширные участки вакуольной дистрофии с выраженными процессами плазмолиза и кариолиза гепатоцитов, отек паренхимы. Сформировались мостовидные соединительнотканые септы, индуцирующие сближение портальных зон (мостовидный фиброз, рис. 1, в). Вдоль этих фиброзных септ наблюдали гепатоциты, которые превосходили размеры нормальных клеток в 1,5–2,0 раза с крупным ядром и темной оксифильной цитоплазмой. Одновременно отмечали участки с дисконформацией пластинчатого строения классических печеночных долек и места с непораженной паренхимой. В отдельных зонах определяли централобулярный и периллюлярный фиброз. Это указывает на нелинейность протекающих патоморфологических изменений в печени. Степень фиброза через 5 нед — F2/F3, а через 7 нед — F3/F4.

По окончании 9-й недели вблизи триад имело место начало процесса узелковой трансформации паренхимы с формированием единичных ложных печеночных долек (F4/F5, рис. 1, г). Увеличения зон некроза и некробиоза гепатоцитов не выявляли. При этом отметили значительное разрастание патологической соединительной ткани вокруг портальных зон и образование толстых фиброзных соединительнотканых септ по периферии ложных печеночных долек.

Процесс инициации и начальные этапы развития

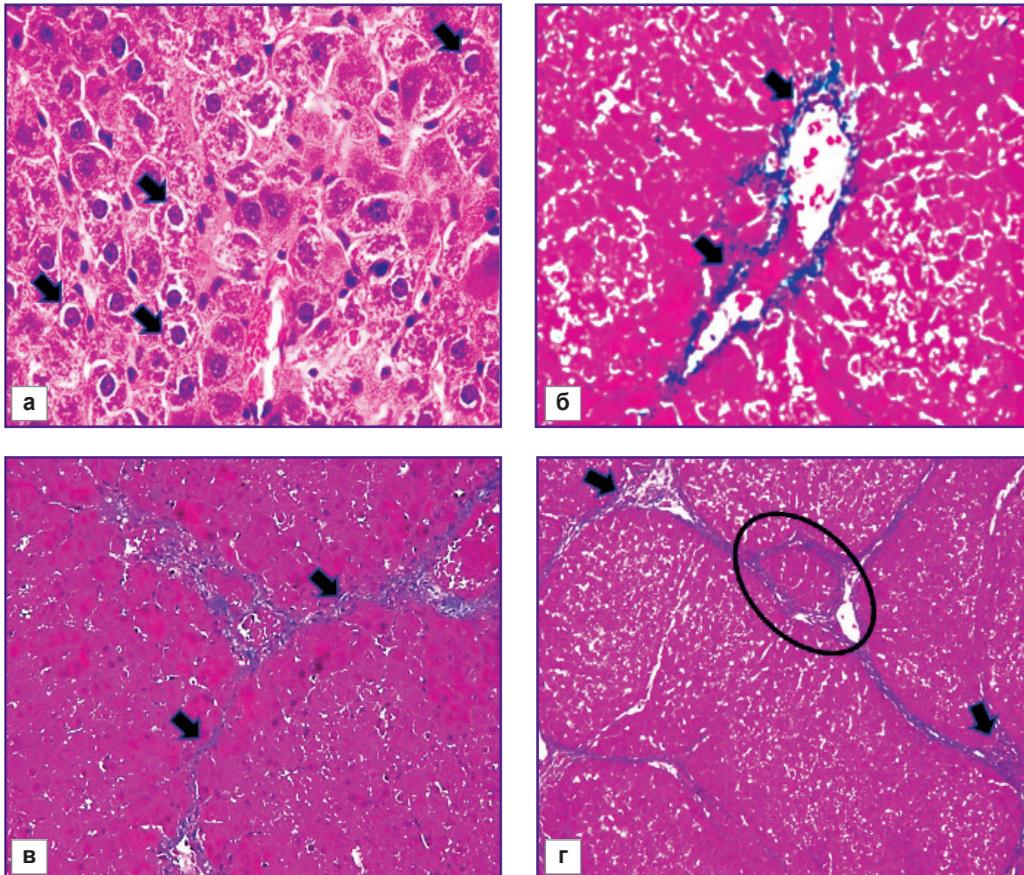


Рис. 1. Фрагменты печени крыс через 3 нед (а, б), 7 нед (в), 9 нед (г) после начала эксперимента: окраска гематоксилином и эозином, $\times 60$ (а); окраска по Маллори, $\times 40$ (б, в), $\times 20$ (г); а — перинуклеарный отек (стрелки); б — фиброзная соединительная ткань в портальной зоне (стрелки); в — фиброзные септы между портальными зонами (стрелки); г — ложная печеночная долька (овальная рамка), ангиогенез в портальных зонах (стрелки)

фиброза развивались при слабой выраженности клеточной инфильтрации (зернистые лейкоциты, лимфоциты). На стадии F4/F5 в триадах, фиброзных септах и паренхиме происходило увеличение количества клеток инфильтрата. В печени крыс жировую дистрофию не диагностировали.

Структурно-функциональные нарушения сосудистого русла печени крыс. На всех этапах эксперимента установлено увеличение площади междольковых вен ($p=0,000$) по сравнению с контрольной группой. Вены часто имели гигантские размеры и неправильную форму с множеством лакун (рис. 2, а). В фиброзных септах и портальных зонах наблюдали выраженный ангиогенез (см. рис. 1, г). Он проявлялся формированием множества венул и мелких вен. Эндотелиоциты в венозных сосудах имели вид вертикальных клеток с неровной апикальной поверхностью. В сосудах отмечали сладж-феномен эритроцитов. Со стороны междольковых артерий изменений практически не наблюдали. В местах значительного расширения синусоидных капилляров визуализировались пространства Диссе. Центральные вены на срезах практически не выявляли.

В печени контрольных и всех опытных крыс эндотелиальные клетки междольковых артерий, междольковых, центральных и поддольковых вен экспрессировали маркеры CD34 и CD31. В синусоидных капиллярах маркер CD31 проявлял зональность (рис. 2, б). В центральной и перипортальной зоне классической долики визуализировались клетки CD31⁺ с более интенсивной окраской, в промежуточной части отмечали снижение экспрессии, местами с полным отсутствием иммуногистохимической реакции. Прогрессирование фиброгенеза сопровождалось увеличением площади клеток CD31⁺ ($p=0,0000$) в синусоидных капиллярах (рис. 2, г; рис. 3). Клетки CD34⁺ в синусоидных капиллярах контрольных и опытных крыс не выявляли, они наблюдались только в междольковых венах (рис. 2, в).

На гистологических препаратах отчетливо визуализировались лимфатические сосуды крупного диаметра, что явно указывает на развитие лимфостаза на фоне прогрессирующих застойных процессов. Расширенные и деформированные лимфатические сосуды не экспрессировали маркеры CD34 и CD31.

Морфофункциональные изменения клеток

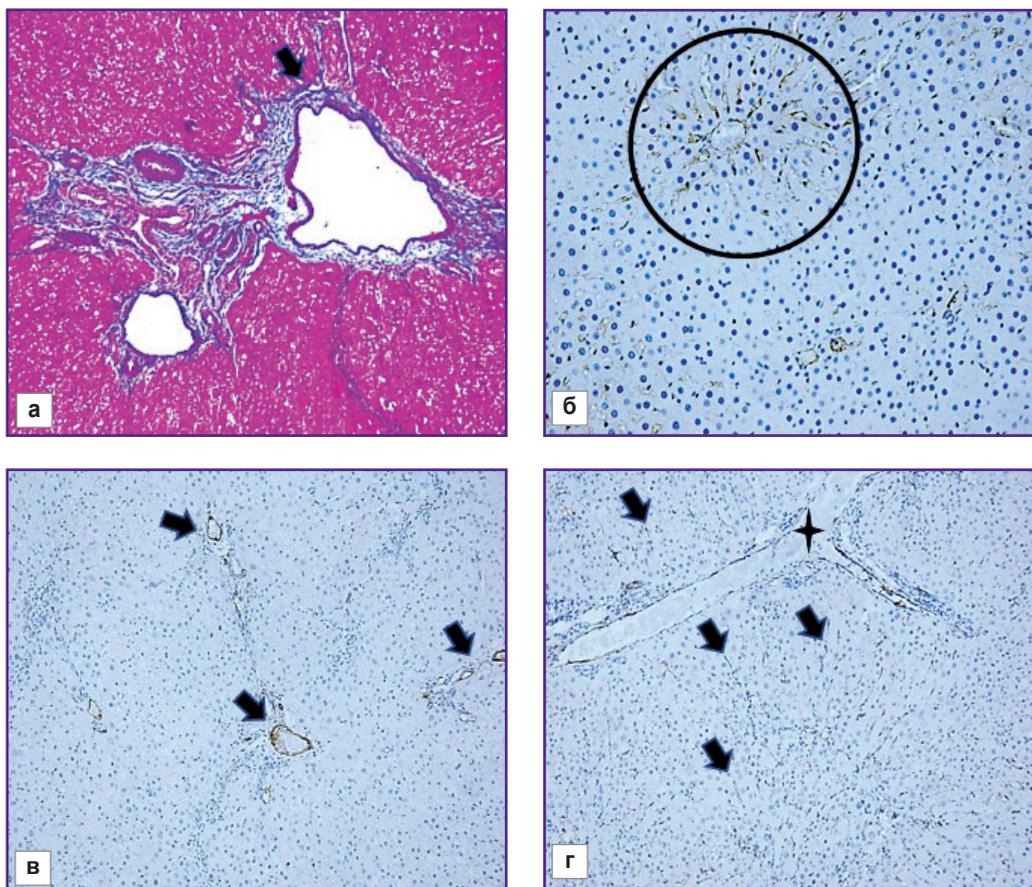


Рис. 2. Фрагменты печени крыс контрольной группы (б), через 5 нед (а), 3 нед (в, г) после начала эксперимента:
 окраска по Маллори, $\times 20$ (а); иммуногистохимическое окрашивание на CD31, докраска гематоксилином Майера, $\times 40$ (б), $\times 20$ (а); иммуногистохимическое окрашивание на CD34, докраска гематоксилином Майера, $\times 20$ (в); а — междольковая вена неправильной формы (стрелка); б — клетки CD31⁺ в синусоидах центральной зоны классической печеночной дольки (круглая рамка); в — клетки CD34⁺ в междольковых венах (стрелки); г — клетки CD31⁺ в синусоидах (стрелки) и междольковой вене (звезда)

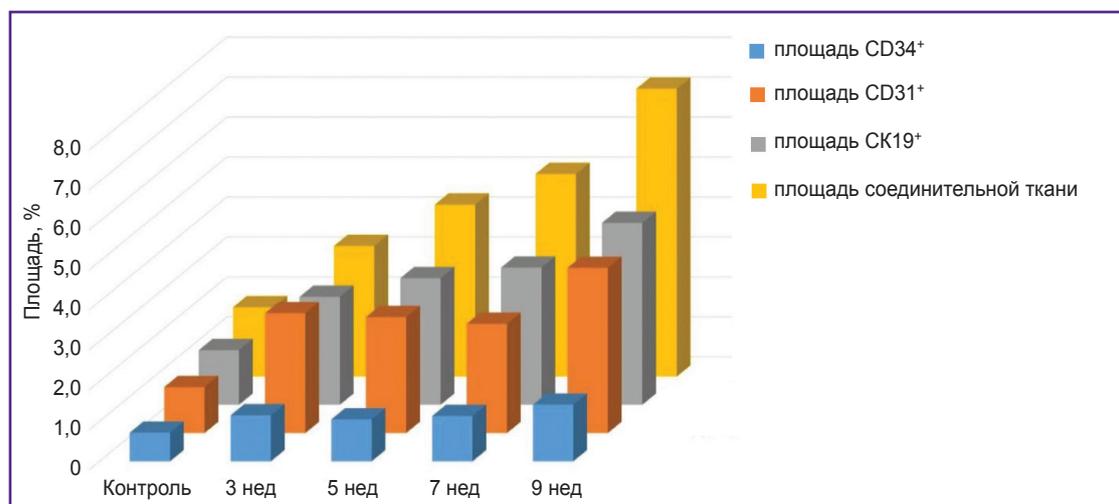


Рис. 3. Изменение площади клеток CD31⁺, CD34⁺, СК19⁺ при разрастании фиброзной соединительной ткани

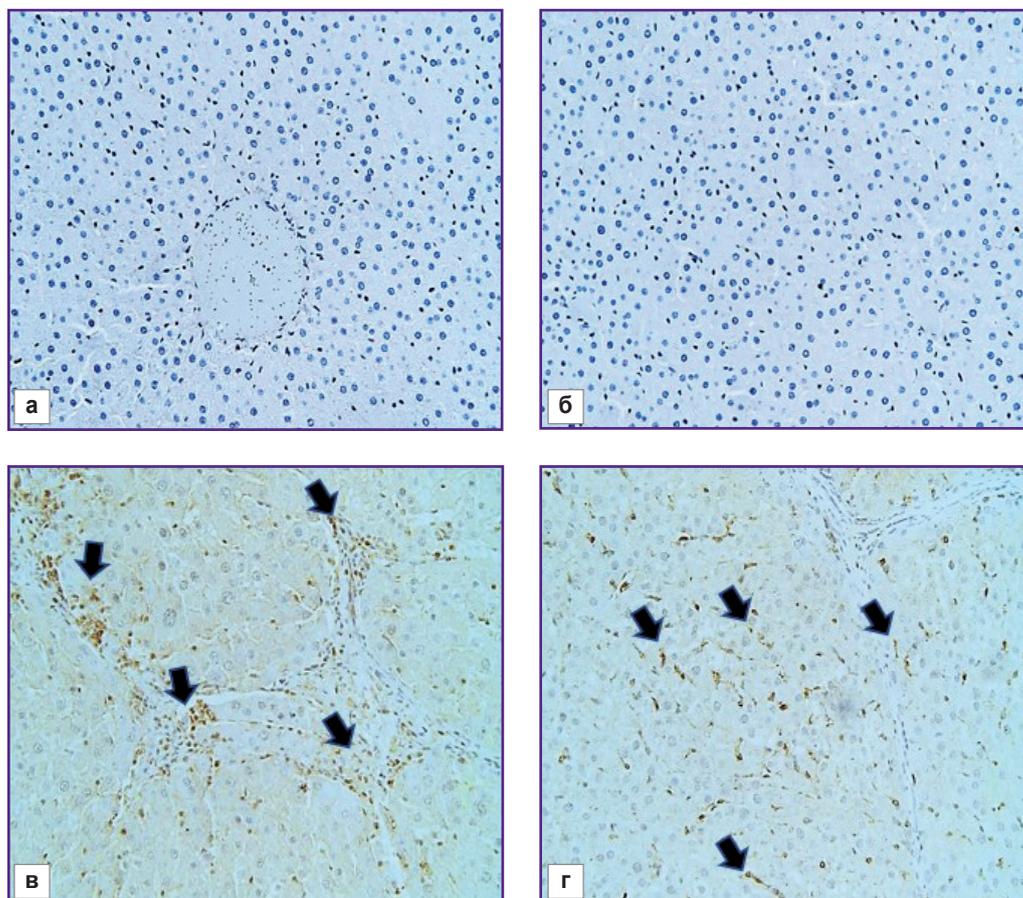


Рис. 4. Фрагменты печени крыс контрольной группы (а, б) и через 9 нед (в, г) после начала эксперимента:

иммуногистохимическое окрашивание на FAP, докраска гематоксилином Майера, $\times 40$ (а, в); иммуногистохимическое окрашивание на α -SMA, докраска гематоксилином Майера, $\times 40$ (б, г); а — клетки FAP⁺ отсутствуют; б — клетки α -SMA⁺ отсутствуют; в — клетки FAP⁺ в фиброзных септах (стрелки); г — клетки α -SMA⁺ в синусоидах (стрелки)

FAP⁺, α -SMA⁺ и CD45⁺. Клетки, экспрессирующие маркер FAP в печени контрольных крыс, отсутствовали (рис. 4, а). В синусоидных капиллярах не отмечали клетки α -SMA⁺ (рис. 4, б), но в отдельных случаях их выявляли в стенках междольковых артерий, междольковых и поддольковых вен. На стадии F1 выявили клетки FAP⁺ и α -SMA⁺. С появлением мостовидного фиброза F2/F3 количество клеток FAP⁺ увеличилось ($p=0,0213$), а клеток α -SMA⁺ — не изменилось ($p=0,3075$) по сравнению со сроком 3 нед. На всех последующих стадиях фиброза установлен рост числа как клеток FAP⁺ ($p=0,0000$), так и клеток α -SMA⁺ ($p=0,0000$) по сравнению со сроком 3 нед (рис. 5).

Две морфологически неоднородные популяции миофибробластов, экспрессирующие различные типы маркеров, имели отличительную локализацию на ранних сроках исследований. Клетки α -SMA⁺ до начала процесса трансформации фиброза в цирроз F4/F5 определяли в синусоидных капиллярах (рис. 4, г) и очагах некроза, а в конце эксперимента они отмечались и в соединительнотканых септах. Клетки FAP⁺

располагались вокруг междольковых сосудов и вблизи междольковых желчных протоков, а со стадии F2/F3 их выявляли в фиброзных трабекулах (рис. 4, в) и реже — в синусоидных капиллярах.

Наблюдали рост клеток CD45⁺, однако по мере прогрессирования фиброза темпы его замедлялись (см. рис. 5). В печени экспериментальных крыс зоной локализации клеток CD45⁺ были триады и септы грубоволокнистой соединительной ткани.

Изменение субпопуляций макрофагов в печени крыс. В печени контрольных крыс клетки CD68⁺ крыловидной формы наблюдали преимущественно в синусоидных капиллярах (рис. 6, а). Незначительное их количество отмечали около междольковых сосудов и центральных вен. Клетки, экспрессирующие CD206 и CX3CR1, выявляли крайне редко (рис. 6, б и в).

На всех стадиях фиброза количество клеток CD68⁺, CD206⁺ и CX3CR1⁺ ($p=0,0000$ во всех случаях) превышало контрольный уровень (см. рис. 5). Одна субпопуляция клеток CD68⁺ имела крыловидную форму и находилась преимущественно в синусоидных

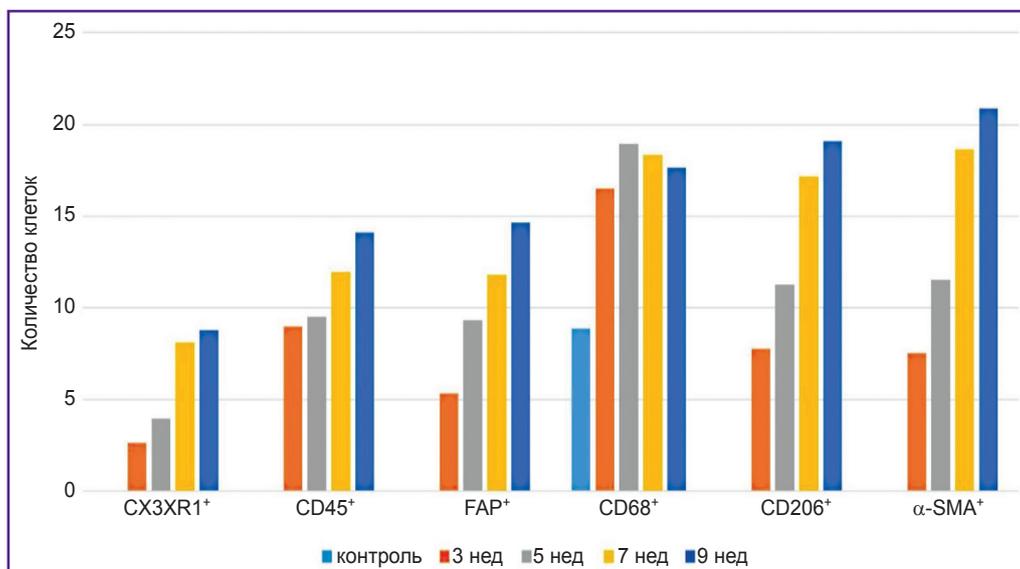


Рис. 5. Изменение количества клеток CD68⁺, CD206⁺, CX3CR1⁺, CD45⁺, FAP⁺, α-SMA⁺ при разрастании фиброзной соединительной ткани

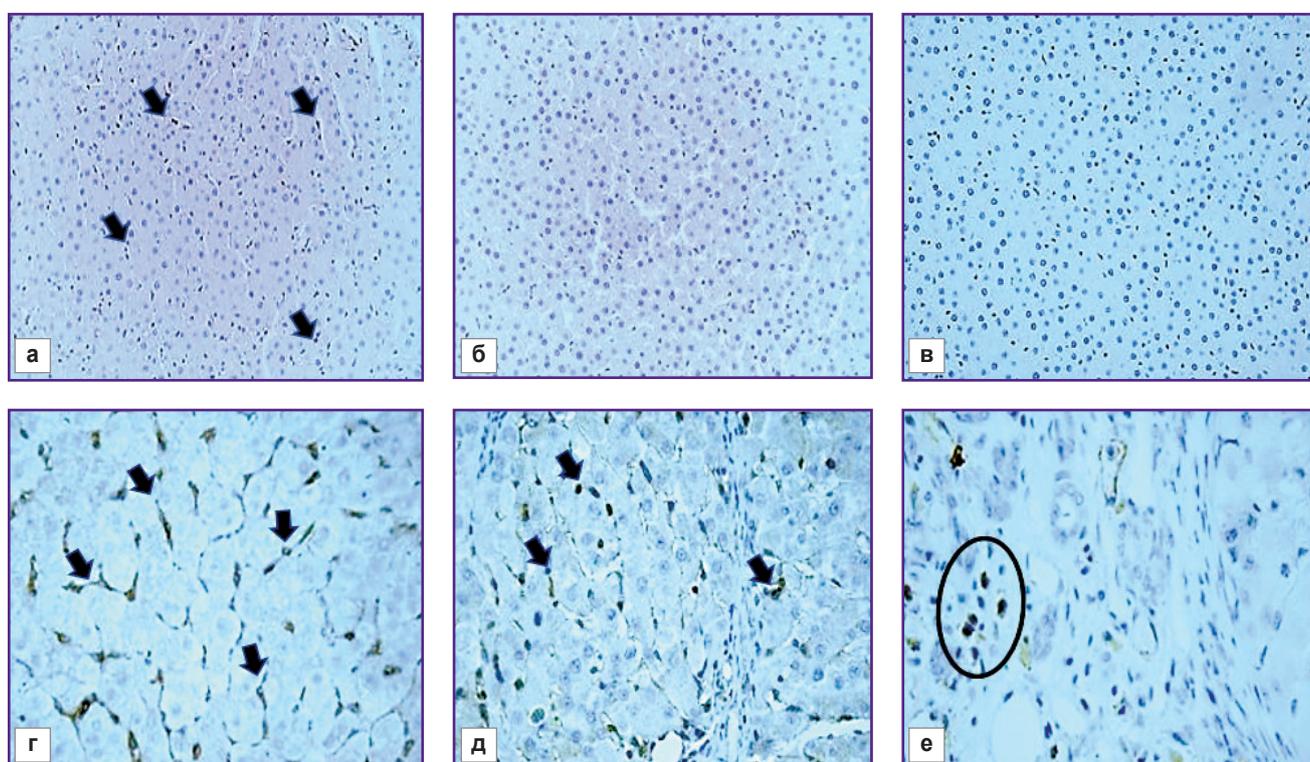


Рис. 6. Фрагменты печени крыс контрольной группы (а, б, в), через 5 нед (д), 7 нед (е) после начала эксперимента: иммуногистохимическое окрашивание на CD68, докраска гематоксилином Майера, ×40 (а), ×60 (з); иммуногистохимическое окрашивание на CD206, докраска гематоксилином Майера, ×40 (б); ×60 (д); иммуногистохимическое окрашивание на CX3CR1, докраска гематоксилином Майера, ×40 (в), ×60 (е); а, з — клетки CD68⁺ в синусоидах (стрелки); б — клетки CD206⁺ отсутствуют; в — клетки CX3CR1⁺ отсутствуют; д — клетки CD206⁺ в синусоидах (стрелки); е — группа клеток CX3CR1⁺ в портальной зоне (овальная рамка)

капиллярах. Чаще они располагались друг за другом, формируя цепочки (рис. 6, з), но иногда локализовались рядом по две-три клетки, контактируя друг

с другом. Вторая субпопуляция клеток CD68⁺ была округлой формы и встречалась в разных местах гистологического среза: вокруг кровеносных сосудов и

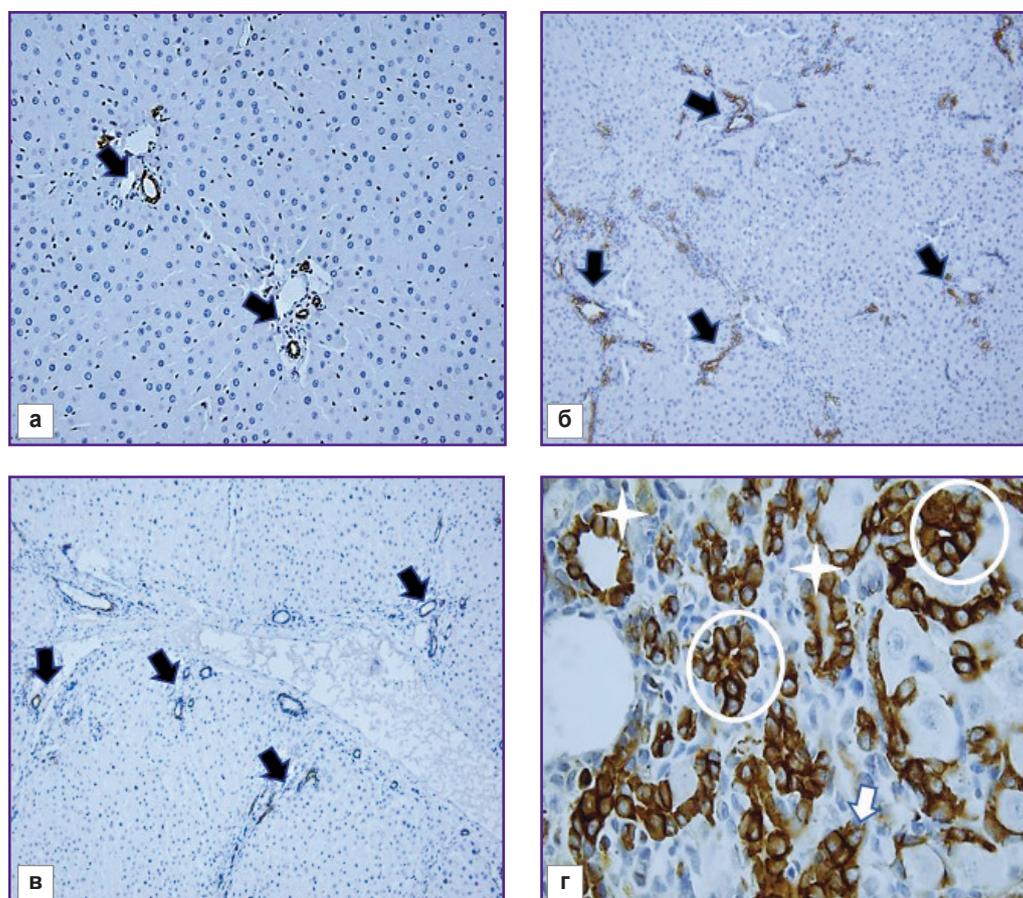


Рис. 7. Фрагменты печени крыс контрольной группы (а), через 3 нед (б) и 5 нед (в, г) после начала эксперимента:

иммуногистохимическое окрашивание на СК19, докраска гематоксилином Майера, $\times 40$ (а), $\times 20$ (б, в), $\times 100$ (г); а, б, в — междольковые желчные протоки (стрелки); г — скопление клеток СК19⁺ без просвета (стрелка), скопление клеток СК19⁺ с намечающимся просветом (круглая рамка), скопление клеток СК19⁺ со сформированным просветом (звезда)

междольковых желчных протоков триад, в очагах некроза гепатоцитов; клетки окружали скопления бурого пигмента, формируя кольцо; иногда они скапливались группами вокруг одиночно лежащих или группы гигантских гепатоцитов и печеночных клеток, содержащих в цитоплазме бурый пигмент. Клетки CD206⁺ округло-вытянутой формы в основном выявлялись в синусоидных капиллярах в виде цепочек на всех этапах эксперимента (рис. 6, д). Клетки CX3CR1⁺ округлой формы в начале исследования локализовались главным образом в портальных зонах, а на последующих этапах — в фиброзных септах (рис. 6, е). Встречались участки срезов печени с отчетливой миграцией клеток CX3CR1⁺ из просвета сосуда в паренхиму. Это доказывает их костномозговое происхождение.

Морфофункциональная оценка клеток СК19⁺. В холангиоцитах протоков и проточков печени контрольных крыс интенсивно экспрессировался билиарный маркер цитокератин СК19 (рис. 7, а). Клетки эпителия междольковых протоков имели кубическую

форму, светлые и крупные ядра с гипербазофильными ядрышками. Эпителиальные клетки СК19⁺ желчных проточков были ближе к плоской форме с цитоплазмой, окрашенной в коричневый цвет. Фиброгенез печени сопровождался увеличением числа междольковых желчных протоков, проточков и одиночно лежащих клеток СК19⁺ в триадах и фиброзных септах (см. рис. 3; рис. 7, б и в). Наблюдали стадии формирования междольковых желчных протоков: от округлых розеткообразных скоплений клеток без просвета и структур с намечающимся просветом до полностью сформированных протоков (рис. 7, г).

Экспрессия мРНК исследуемых генов. Выбранные гены-мишени реагировали на прогрессирование фиброза неодинаково. Мы выявили два варианта изменения их экспрессии (рис. 8). Наблюдали рост мРНК *fn14* и *ttpr-9*. Уровень мРНК гена *fn14* на всех стадиях фиброза был выше ($p=0,0000$), чем у крыс контрольной группы. На стадии F1 экспрессия мРНК *ttpr-9* несколько снизилась, а затем отмечался ее

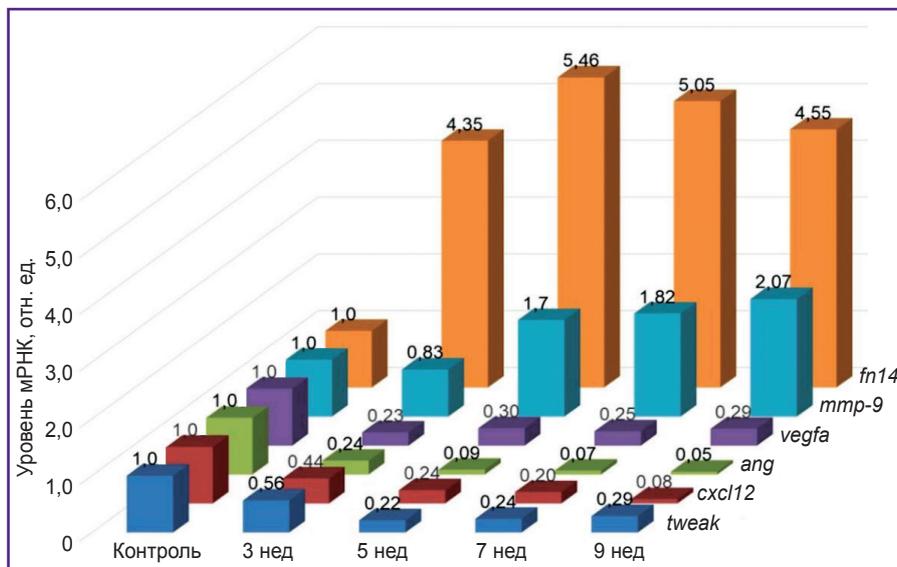


Рис. 8. Изменение уровня экспрессии мРНК генов *tweak*, *fn14*, *ang*, *vegfa*, *cxcl12* и *mmp-9* при разрастании фиброзной соединительной ткани

рост ($p=0,0000$) по сравнению с контрольной группой.

В отношении остальных мишеней ситуация оказалась противоположной — уровень мРНК генов упал. Стремительное падение отмечено для генов *ang* ($p=0,0000$) и *cxcl12* ($p=0,0000$) по сравнению с контрольной группой. Снижение мРНК *vegfa* ($p=0,0000$) и *tweak* ($p=0,0000$) было не резким и практически одинаковым на стадиях F2/F3–F4/F5.

Обсуждение

Соединительная ткань. Углубленное изучение источника фиброгенной популяции клеток имеет фундаментальное значение для разработки антифибротических препаратов [21, 22]. В нашем исследовании количество клеток α -SMA⁺ нарастает линейно. Полученные результаты согласуются с данными других авторов [34, 35]. Клетки FAP⁺ на стадии F1 располагались в портальных зонах рядом с клетками SK19⁺. Установлено, что клетки SK19⁺ экспрессируют профиброгенные факторы (TGF- β , PDGF) и могут активировать портальные фибробласты [36]. На гистологических препаратах мы наблюдали направленное разрастание волокон патологической соединительной ткани с клетками FAP⁺ от двух портальных зон через паренхиму печени навстречу друг другу, что предопределяет путь для фиброзной ткани и формирования соединительнотканых мостов — мостовидный фиброз. Начало процесса узелковой трансформации паренхимы происходило вблизи портальных зон.

Общеизвестно, что основная функция фибробластов — это синтез межклеточного вещества [21, 37]. Предположительно, получая сигнал от измененного состояния ниши (микроокружения), клетки FAP⁺ первыми синтезируют межклеточное вещество в печеночных триадах и, возможно, регулируют его секре-

цию, участвуя в формировании патологических септ (мостов). Клетки α -SMA⁺ вступают в роль миофибробластов позже. Вероятно, этап активации и трансдифференцировки жиронакапливающих клеток более продолжительный или молекулярные сигналы, регулирующие смену фенотипа клеток, индуцируются с опозданием либо ингибируются до какого-то определенного момента. Основное место локализации жиронакапливающих клеток — синусоидные капилляры. На начальных этапах клетки α -SMA⁺ отвечают за перицеллюлярный фиброз и синтез соединительной ткани в очагах некроза. Нельзя исключать, что процесс активации портальных фибробластов и

жиронакапливающих клеток регулируется различными механизмами, которые еще предстоит изучить.

Роль белка FAP и его фармакологическое ингибирование в качестве потенциальной терапии фиброза печени до конца не изучены. Считают, что белок FAP стимулирует воспаление, выполняет профиброгенную функцию и принимает участие в регуляции энергетического и липидного обмена [36, 37]. В рамках настоящего исследования жировая дистрофия не выявлена и до стадии фиброза F4/F5 наблюдали слабую степень выраженности клеточной инфильтрации (зернистые лейкоциты, лимфоциты). Вероятно, функции белка FAP обусловлены состоянием ниши (эпигенетические механизмы, активность генов, фенотипический профиль клеток, плотность соединительной ткани).

Клетки. В печени крыс на разных стадиях индуцированного ТАА фиброза изменяются количество, локализация, фенотипический состав и функциональные свойства макрофагов. По данным ряда исследователей, клетки, экспрессирующие маркер CD68, являются резидентными (местными) звездчатыми макрофагами, обладают пластичностью, изменяя свой фенотип в ответ на сигналы ниши (M1-фенотип, классически активированные, и M2-фенотип, альтернативно активированные) [23, 24]. Некоторые ученые считают бинарную классификацию несостоятельной, предполагая, что существует ряд промежуточных состояний дифференцировки этих клеток [2, 38]. Иммуногистохимическим методом выявлены три морфологически разные группы звездчатых макрофагов, отличающиеся формой и локализацией. По-видимому, субпопуляция клеток CD68⁺ округлой формы выполняет преимущественно фагоцитарную функцию, субпопуляция клеток CD68⁺ крыловидной формы пополняет популяцию клеток CD206⁺ (противовоспалительный M2-фенотип звездчатых макрофагов), а они в свою очередь обуслов-

ливают слабую степень выраженности клеточной инфильтрации. По мере прогрессирования фиброза количество клеток CD45⁺ уменьшалось. При этом популяция клеток CX3CR1⁺ увеличивалась. Полученные результаты согласуются с данными других исследований [2, 24]: при патологии печени происходило усиление образования моноцитов в красном костном мозге, ускорялись их миграция и дифференцировка в макрофаги. Авторы не сообщают о точной локализации и количестве инфильтрирующих макрофагов, не уточняют, на какой стадии фиброза они появляются. В настоящей работе клетки CX3CR1⁺ располагались в триадах и фиброзных септах, преимущественно формируя группы от 4 до 8, и крайне редко встречались поодиночке. Выявились такие клетки на стадии портального фиброза. Это наводит на мысль об их участии в регуляции функций полиморфных клеток патологических септ.

При многих хронических заболеваниях печени в области печеночных триад наблюдают пролиферацию холангиоцитов (протоковая или дуктулярная реакция). Существуют разногласия в отношении роли этой реакции [27]. Одни ученые считают, что клетки дуктулярной реакции принимают участие в регенерации печени путем дифференцировки в гепатоциты [39]. Другие авторы установили корреляционную связь между дуктулярной реакцией и фиброзом печени и предположили, что она усиливает фиброгенез [40]. В настоящей работе клетки СК19⁺ портальных зон дифференцируются в холангиоциты, формирующие междольковые желчные протоки и проточки, и гепатоциты, формирующие зачатки новых печеночных микродолек.

Внутрипеченочная сосудистая сеть. В печени крыс со стороны артериальной системы выраженных изменений не выявлено. Можно предположить, что

это связано с перестройкой энергетического обмена клеток и повышением роли гликолиза в энергопроизводстве. При этом увеличивается количество энергии и метаболитов, необходимых для интенсификации синтеза белков внеклеточного матрикса. Потребности в кислороде остаются практически на неизменном уровне. Увеличение портального кровотока связано с расширением диаметра междольковых вен и с патологическим венозным ангиогенезом. Изменение формы и апикального полюса эндотелиальных клеток в сосудах венозного типа можно охарактеризовать как компенсацию затруднения кровотока в системе воротной вены ввиду прогрессирования отека и механической компрессии вен за счет фиброза.

Отсутствие экспрессии маркера CD34 в эндотелиоцитах синусоидных капилляров контрольных и опытных крыс свидетельствует о морфологической гетерогенности эндотелиальных клеток печени и связано со строением сосудов. Выявленная в настоящем исследовании капилляризация синусоидов согласуется с данными других исследований [5, 12, 13, 41]. Вероятно, этот процесс предшествует активации жиронакапливающих клеток и способствует прогрессированию фиброза. Увеличение диаметра лимфатических сосудов явно указывает на развитие лимфостаза на фоне прогрессирующих застойных процессов.

Гены-мишени. Между исследуемыми генами *tweak*, *fn14*, *ang*, *vegfa*, *cxcl12* и *mmp-9* при прогрессировании фиброза печени выявили положительные и отрицательные сильные или умеренные корреляции ($p < 0,05$, рис. 9).

Наибольшее число связей установлено для *cxcl12*. Белок CXCL12 отвечает за ряд важных функций, среди которых хемотаксис, миграция клеток и их адгезия, пролиферация и др. [42]. Продукты *ang* и *vegfa* вовлекаются в процессы ангиогенеза, однако на уровне

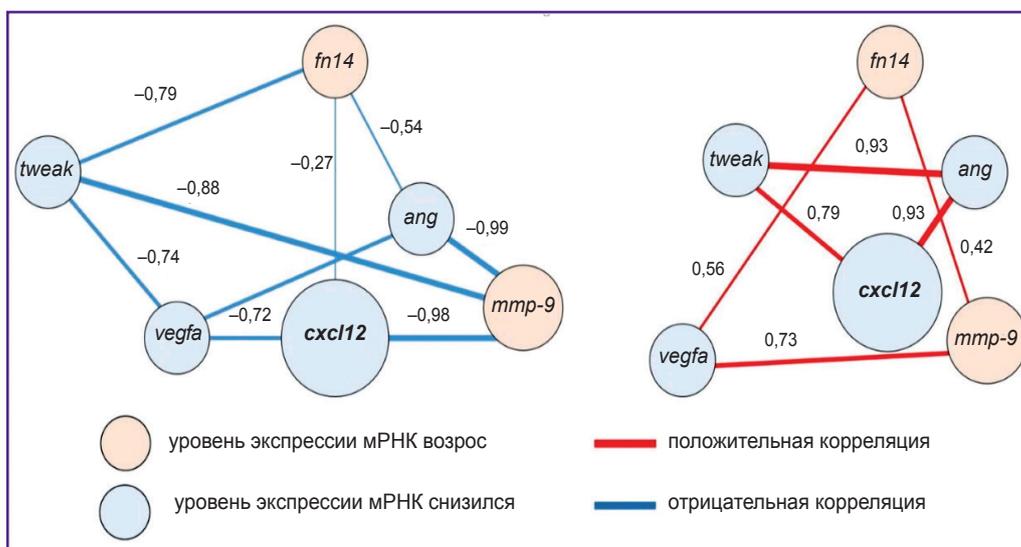


Рис. 9. Корреляционные связи между генами *tweak*, *fn14*, *ang*, *vegfa*, *cxcl12* и *mmp-9* при разрастании фиброзной соединительной ткани

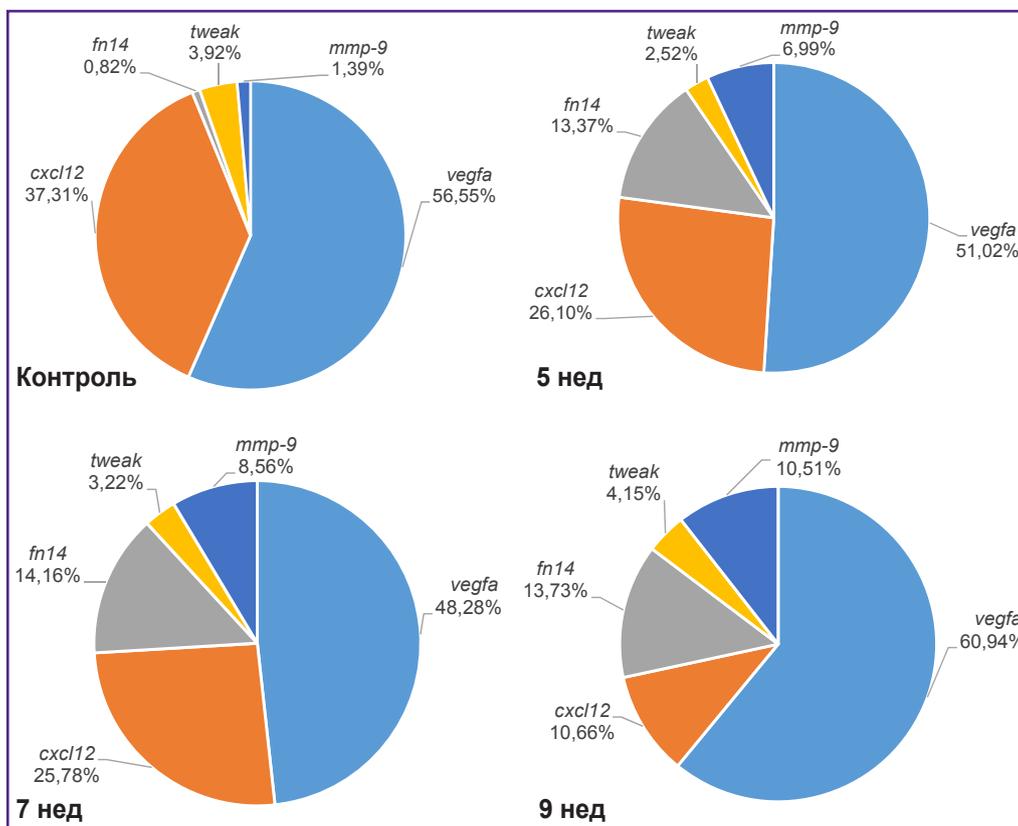


Рис. 10. Процентное соотношение абсолютного числа копий мРНК генов *tweak*, *fn14*, *ang*, *vegfa*, *cxcl12* и *mmp-9* при разрастании фиброзной соединительной ткани

мРНК существует их связь с гораздо большим числом молекулярных процессов [12, 13, 16, 17]. Известно, что белок MMP-9 играет ключевую роль в процессах обновления соединительной ткани, а также контролирует ее формирование в норме [15]. Сообщается, что комплекс Tweak/Fn14 способствует накоплению соединительной ткани в органах [18, 19, 20, 43].

Вероятно, установленные в настоящем исследовании корреляции для уровней мРНК генов-мишеней могут свидетельствовать об их роли в фиброгенезе печени. Совместное относительно друг друга изучение генов является необходимым дополнительным параметром при проведении фундаментальных и доклинических исследований.

Интересно отметить наличие сильной корреляции между генами, уровень мРНК которых снизился относительно контрольных значений. Это может быть объяснено тем, что при общей тенденции снижение уровня экспрессии мРНК происходило неравномерно для разных генов. Данный процесс привел к изменению исходных процентных соотношений абсолютного числа копий мРНК (рис. 10). Например, в случае гена *vegfa* на протяжении всего эксперимента процентное содержание его мРНК по отношению к остальным генам-мишеням составило в среднем 54,2% и варьировало в пределах 12,5%. В то же время процентное отношения мРНК гена *cxcl12* снизилось в 3,5 раза (с

37,30 до 10,66%) также при снижении относительного уровня экспрессии мРНК.

Заключение

На основании полученных результатов установлено, что стадии токсического фиброза имеют морфологические и молекулярно-генетические особенности. Клетки FAP⁺ вносят основной вклад в развитие портального и начального этапа мостовидного фиброза. Их можно рассматривать как одну из популяций миофибробластов при тиацетамид-индуцированном фиброгенезе печени.

Прогрессирование фиброза печени сопровождается изменением количества, локализации, фенотипического состава и функциональных свойств макрофагов.

Выявлен патологический венозный ангиогенез. При исследовании внутрипеченочного сосудистого русла необходимо учитывать особенности экспрессии маркеров эндотелиоцитами.

Между генами-мишенями *tweak*, *fn14*, *ang*, *vegfa*, *cxcl12*, *mmp-9* установлены значимые корреляционные связи ($r=0,42-0,98$; $p<0,05$), свидетельствующие об их роли в развитии и инициации фиброза печени.

Финансирование исследования. Работа выполнена в рамках государственной программы научных

исследований «Фундаментальные и прикладные науки — медицине» Министерства здравоохранения Республики Беларусь, задание 2.89 «Изучить роль экспрессии генов NOTCH- и TWEAK-сигнальных путей, участвующих в процессах пролиферации и дифференцировки клеток печени в норме и при ее токсическом поражении» (регистрационный номер 20190107).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

- Asrani S.K., Devarbhavi H., Eaton J., Kamath P.S. Burden of liver diseases in the world. *J Hepatol* 2019; 70(1): 151–171, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.014>.
- Roehlen N., Crouchet E., Baumert T.F. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives. *Cells* 2020; 9(4): 875, <https://doi.org/10.3390/cells9040875>.
- Xu M., Xu H.H., Lin Y., Sun X., Wang L.J., Fang Z.P., Su X.H., Liang X.J., Hu Y., Liu Z.M., Cheng Y., Wei Y., Li J., Li L., Liu H.J., Cheng Z., Tang N., Peng C., Li T., Liu T., Qiao L., Wu D., Ding Y.Q., Zhou W.J. LECT2, a ligand for Tie1, plays a crucial role in liver fibrogenesis. *Cell* 2019; 178(6): 1478–1492.e20, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.021>.
- Friedman S.L., Pinzani M. Hepatic fibrosis 2022: unmet needs and a blueprint for the future. *Hepatology* 2022; 75(2): 473–488, <https://doi.org/10.1002/hep.32285>.
- Lin Y., Dong M.Q., Liu Z.M., Xu M., Huang Z.H., Liu H.J., Gao Y., Zhou W.J. A strategy of vascular-targeted therapy for liver fibrosis. *J Hepatology* 2022; 76(3): 660–675, <https://doi.org/10.1002/hep.32299>.
- Zhang D., Zhang Y., Sun B. The molecular mechanisms of liver fibrosis and its potential therapy in application. *Int J Mol Sci* 2022; 23(20): 12572, <https://doi.org/10.3390/ijms232012572>.
- Borrello M.T., Mann D. Chronic liver diseases: from development to novel pharmacological therapies: IUPHAR review 37. *Br J Pharmacol* 2022, <https://doi.org/10.1111/bph.15853>.
- Jangra A., Kothari A., Sarma P., Medhi B., Omar B.J., Kaushal K. Recent advancements in antifibrotic therapies for regression of liver fibrosis. *Cells* 2022; 11(9): 1500, <https://doi.org/10.3390/cells11091500>.
- Li Y., Yuan S.L., Yin J.Y., Yang K., Zhou X.G., Xie W., Wang Q. Differences of core genes in liver fibrosis and hepatocellular carcinoma: evidence from integrated bioinformatics and immunohistochemical analysis. *World J Gastrointest Oncol* 2022; 14(7): 1265–1280, <https://doi.org/10.4251/wjgo.v14.i7.1265>.
- Antar S.A., Ashour N.A., Marawan M.E., Al-Karmalawy A.A. Fibrosis: types, effects, markers, mechanisms for disease progression, and its relation with oxidative stress, immunity, and inflammation. *Int J Mol Sci* 2023; 24(4): 4004, <https://doi.org/10.3390/ijms24044004>.
- Parola M., Pinzani M. Liver fibrosis: pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. *Mol Aspects Med* 2019; 65: 37–55, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.09.002>.
- Li H. Angiogenesis in the progression from liver fibrosis to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2021; 15(3): 217–233, <https://doi.org/10.1080/17474124.2021.1842732>.
- Yang L., Yue W., Zhang H., Zhang Z., Xue R., Dong C., Liu F., Chang N., Yang L., Li L. Dual targeting of Angiopoietin-1 and von Willebrand factor by microRNA-671-5p attenuates liver angiogenesis and fibrosis. *Hepatol Commun* 2022; 6(6): 1425–1442, <https://doi.org/10.1002/hep4.1888>.
- Wallace S.J., Tacke F., Schwabe R.F., Henderson N.C. Understanding the cellular interactome of non-alcoholic fatty liver disease. *JHEP Rep* 2022; 4(8): 100524, <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2022.100524>.
- Quintero-Fabián S., Arreola R., Becerril-Villanueva E., Torres-Romero J.C., Arana-Argáez V., Lara-Riegos J., Ramírez-Camacho M.A., Alvarez-Sánchez M.E. Role of matrix metalloproteinases in angiogenesis and cancer. *Front Oncol* 2019; 9: 1370, <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01370>.
- Hoeben A., Landuyt B., Highley M.S., Wildiers H., Van Oosterom A.T., De Bruijn E.A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004; 56(4): 549–580, <https://doi.org/10.1124/pr.56.4.3>.
- Jones M.L., Ewing C.M., Isaacs W.B., Getzenberg R.H. Prostate cancer-derived angiogenesis stimulates the invasion of prostate fibroblasts. *J Cell Mol Med* 2012; 16(1): 193–201, <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01283.x>.
- Wang M., Xie Z., Xu J., Feng Z. TWEAK/Fn14 axis in respiratory diseases. *Clin Chim Acta* 2020; 509: 139–148, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.06.007>.
- Dwyer B.J., Jarman E.J., Gogoi-Tiwari J., Ferreira-Gonzalez S., Boulter L., Guest R.V., Kendall T.J., Kurian D., Kilpatrick A.M., Robson A.J., O'Duibhir E., Man T.Y., Campana L., Starkey Lewis P.J., Wigmore S.J., Olynyk J.K., Ramm G.A., Tirnitz-Parker J.E.E., Forbes S.J. TWEAK/Fn14 signalling promotes cholangiocarcinoma niche formation and progression. *J Hepatol* 2021; 74(4): 860–872, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.11.018>.
- Short C., Zhong A., Xu J., Mahdi E., Glazier A., Malkoff N., Noriega N., Yeo T., Asahina K., Wang K.S. TWEAK/FN14 promotes profibrogenic pathway activation in Prominin-1-expressing hepatic progenitor cells in biliary atresia. *Hepatology* 2023; 77(5): 1639–1653, <https://doi.org/10.1097/hep.0000000000000026>.
- Dhar D., Baglieri J., Kisseleva T., Brenner D.A. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer. *Exp Biol Med (Maywood)* 2020; 245(2): 96–108, <https://doi.org/10.1177/1535370219898141>.
- Luo N., Li J., Wei Y., Lu J., Dong R. Hepatic stellate cell: a double-edged sword in the liver. *Physiol Res* 2021; 70(6): 821–829, <https://doi.org/10.33549/physiolres.934755>.
- Cheng D., Chai J., Wang H., Fu L., Peng S., Ni X. Hepatic macrophages: key players in the development and progression of liver fibrosis. *Liver Int* 2021; 41(10): 2279–2294, <https://doi.org/10.1111/liv.14940>.
- Wang C., Ma C., Gong L., Guo Y., Fu K., Zhang Y., Zhou H., Li Y. Macrophage polarization and its role in liver disease. *Front Immunol* 2021; 12: 803037, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.803037>.
- Lafoz E., Ruat M., Anton A., Oncins A., Hernández-Gea V. The endothelium as a driver of liver fibrosis and regeneration. *Cells* 2020; 9(4): 929, <https://doi.org/10.3390/cells9040929>.
- Zadorozhna M., Di Gioia S., Conese M., Mangieri D. Neovascularization is a key feature of liver fibrosis progression: anti-angiogenesis as an innovative way of liver fibrosis treatment. *Mol Biol Rep* 2020; 47(3): 2279–2288, <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05290-0>.
- Kumar S., Duan Q., Wu R., Harris E.N., Su Q. Pathophysiological communication between hepatocytes

and non-parenchymal cells in liver injury from NAFLD to liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev* 2021; 176: 113869, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113869>.

28. Банин В.В., Белоусова Т.А., Быков В.Л. *Terminologia Histologica. Международные термины по цитологии и гистологии человека с официальным списком русских эквивалентов: справочное пособие*. Под ред. Банина В.В., Быкова В.Л. М: ГЭОТАР-Медиа; 2009; 272 с.

Banin V.V., Belousova T.A., Bykov V.L. *Terminologia Histologica. Mezhdunarodnye terminy po tsitologii i gistologii cheloveka s ofitsial'nym spiskom russkikh ekvivalentov: spravochnoe posobie* [Terminologia Histologica. International terms in human cytology and histology with the official list of Russian equivalents: a reference guide]. Banin V.V., Bykov V.L. (editors). Moscow: GEOTAR-Media; 2009; 272 p.

29. Muthiah M.D., Huang D.Q., Zhou L., Jumat N.H., Choolani M., Chan J.K.Y., Wee A., Lim S.G., Dan Y.Y. A murine model demonstrating reversal of structural and functional correlates of cirrhosis with progenitor cell transplantation. *Sci Rep* 2019; 9(1): 15446, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51189-7>.

30. *Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии*. Под ред. Коржевского Д.Э. СПб: СпецЛит; 2014; 119 с.

Teoreticheskie osnovy i prakticheskoe primenenie metodov immunogistokhimii [Theoretical bases and practical application of immunohistochemistry methods]. Korzhevskii D.E. (editor). Saint Petersburg: SpetsLit; 2014; 119 p.

31. Zheng C., Luo J., Yang Y., Dong R., Yu F.X., Zheng S. YAP activation and implications in patients and a mouse model of biliary atresia. *Front Pediatr* 2021; 8: 618226, <https://doi.org/10.3389/fped.2020.618226>.

32. Everhart J.E., Wright E.C., Goodman Z.D., Dienstag J.L., Hoefs J.C., Kleiner D.E., Ghany M.G., Mills A.S., Nash S.R., Govindarajan S., Rogers T.E., Greenson J.K., Brunt E.M., Bonkovsky H.L., Morishima C., Litman H.J.; HALT-C Trial Group. Prognostic value of Ishak fibrosis stage: findings from the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial. *Hepatology* 2010; 51(2): 585–594, <https://doi.org/10.1002/hep.23315>.

33. Лебедева Е.И., Бабенко А.С., Щастный А.Т. Динамика стабильности экспрессии генов *sdha*, *hprt*, *prl3d1* и *hes1* в рамках моделирования фиброза печени крыс. *Биомедицина* 2022; 18(2): 17–30, <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-17-30>.

Lebedeva E.I., Babenko A.S., Shchastniy A.T. Stability of

the *sdha*, *hprt*, *prl3d1* and *hes1* gene expression in a rat liver fibrosis model. *Biomedicine* 2022; 18(2): 17–30, <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-17-30>.

34. Younis N.S., Ghanim A.M.H., Elmersy M.A., Metwaly H. Taurine ameliorates thioacetamide induced liver fibrosis in rats via modulation of toll like receptor 4/nuclear factor kappa B signaling pathway. *Sci Rep* 2021; 11(1): 12296, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91666-6>.

35. Wu Y., Li Z., Xiu A.Y., Meng D.X., Wang S.N., Zhang C.Q. Carvedilol attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis and hepatic sinusoidal capillarization in mice. *Drug Des Devel Ther* 2019; 13: 2667–2676, <https://doi.org/10.2147/dddt.s210797>.

36. Yang A.T., Kim Y.O., Yan X.Z., Abe H., Aslam M., Park K.S., Zhao X.Y., Jia J.D., Klein T., You H., Schuppan D. Fibroblast activation protein activates macrophages and promotes parenchymal liver inflammation and fibrosis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2023; 15(4): 841–867, <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2022.12.005>.

37. Fuji H., Miller G., Nishio T., Koyama Y., Lam K., Zhang V., Loomba R., Brenner D., Kisseleva T. The role of mesothelin signaling in portal fibroblasts in the pathogenesis of cholestatic liver fibrosis. *Front Mol Biosci* 2021; 8: 790032, <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.790032>.

38. Dong X., Liu J., Xu Y., Cao H. Role of macrophages in experimental liver injury and repair in mice. *Exp Ther Med* 2019; 17(5): 3835–3847, <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7450>.

39. Kamimoto K., Nakano Y., Kaneko K., Miyajima A., Itoh T. Multidimensional imaging of liver injury repair in mice reveals fundamental role of the ductular reaction. *Commun Biol* 2020; 3(1): 289, <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1006-1>.

40. Sato K., Marziani M., Meng F., Francis H., Glaser S., Alpini G. Ductular reaction in liver diseases: pathological mechanisms and translational significances. *Hepatology* 2019; 69(1): 420–430, <https://doi.org/10.1002/hep.30150>.

41. Augustin H.G., Koh G.Y. Organotypic vasculature: from descriptive heterogeneity to functional pathophysiology. *Science* 2017; 357(6353): eaal2379, <https://doi.org/10.1126/science.aal2379>.

42. Zhou W., Guo S., Liu M., Burow M.E., Wang G. Targeting CXCL12/CXCR4 axis in tumor immunotherapy. *Curr Med Chem* 2019; 26(17): 3026–3041, <https://doi.org/10.2174/0929867324666170830111531>.

43. Zhang Y., Zeng W., Xia Y. TWEAK/Fn14 axis is an important player in fibrosis. *J Cell Physiol* 2021; 236(5): 3304–3316, <https://doi.org/10.1002/jcp.30089>.