

ФАКТОРНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ФИБРОГЕНЕЗЕ ПЕЧЕНИ

Лебедева Е. И.

кандидат биологических наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», г. Витебск, Беларусь
lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru

Щастный А. Т.

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой госпитальной хирургии с курсом ФПК и ПК учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», г. Витебск, Беларусь
rectorvsmi@gmail.com

Бабенко А. С.

кандидат химических наук, доцент кафедры биоорганической химии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Беларусь
labmdbt@gmail.com

Аннотация. В работе представлены данные о динамике уровня мРНК ключевых генов, вовлекаемых в процессы инициации и развития фиброза печени с использованием модельной системы (крысы линии Wistar, токсический фиброз, тиоацетамид). Проведенный анализ факторов динамики уровня мРНК генов, связанных с процессами ангиогенеза, дифференцировки и миграции клеток, развития воспаления, разрушения белков внеклеточного матрикса и пр. показал, что со стороны молекулярно-генетических событий фиброгенез не является однородным или линейным и одни и те же молекулярные мишени в зависимости от стадии фиброза могут вовлекаться в различные процессы, что в большинстве случаев не отражается на уровне морфологических изменений. Для понимания молекулярных и клеточных механизмов инициации и развития фиброза требуется проведение дополнительных исследований с обязательным подробным рассмотрением всех стадий процесса на клеточном и молекулярном уровне.

Ключевые слова: фиброз печени; токсическая модель; тиоацетамид; мРНК; факторный анализ; гены

FACTOR ANALYSIS OF GENE EXPRESSION IN EXPERIMENTAL LIVER FIBROGENESIS

Lebedeva E. I.

PhD, associate professor

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Belarus

lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru

Shchastniy A. T.

MD, PhD, full professor

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Belarus

rectorvsmu@gmail.com

Babenka A. S.

PhD, associate professor

Belarussian State Medical University, Minsk, Belarus

labmdbt@gmail.com

Annotation. *Data on the dynamics of mRNA levels of key genes involved in the processes of initiation and development of liver fibrosis are presented. A model system was used (Wistar rats, toxic fibrosis, thioacetamide). The analysis of the factors of the dynamics of the mRNA level of genes associated with the processes of angiogenesis, differentiation and migration of cells, the development of inflammation, the destruction of extracellular matrix proteins, etc. showed that from the side of molecular genetic events, fibrogenesis is not homogeneous or linear and the same molecular targets depending on the stage of fibrosis, they can be involved in various processes, which in most cases is not reflected in the level of morphological changes. To understand the molecular and cellular mechanisms of initiation and development of fibrosis, additional studies are required with a mandatory detailed consideration of all stages of the process at the cellular and molecular level.*

Keywords: *liver fibrosis; toxic model; thioacetamide; mRNA; factor analysis; genes*

Введение. В процессы инициации и прогрессирования фиброза печени вовлекаются многие молекулярные сигнальные пути. Благодаря использованию технологии высокопроизводительного секвенирования обнаружены гены, уровень мРНК которых статистически значимо изменяется в ответ на воздействие индукторами фиброза. Однако, этих данных все еще недостаточно для понимания всех аспектов процесса, что требует более подробного изучения как отдельных этапов фиброгенеза, так и взаимосвязей между генами, вовлекаемыми в эти процессы.

Анализ литературных источников показал, что гены *notch1*, *notch2*, *yap1*, *tweek (tnfsf12)*, *fn14 (tnfrsf12a)*, *ang*, *vegfa*, *cxcl12 (sdf)*, *nos2* и *mmp-9* очень часто называются ключевыми в процессе фиброгенеза, так как их экспрессия связана с

процессами синтеза и деградация белков внеклеточного матрикса, ангиогенезом, развитием воспаления и миграцией клеток предшественников из костного мозга к очагам повреждения печени [1-6].

Цель работы: выявить взаимосвязи между уровнем мРНК генов *notch1*, *notch2*, *yap1*, *tweek (tnfsf12)*, *fn14 (tnfrsf12a)*, *ang*, *vegfa*, *cxcl12 (sdf)*, *nos2* и *mmp-9* в динамике тиацетамид-индуцированного фиброза печени крыс Вистар.

Материалы и методы. Фиброгенез печени у крыс-самцов Вистар моделировали раствором тиацетамида, который вводили интрагастрально через зонд в дозе 200 мг/кг массы тела 2 раза в нед. Крысы контрольной группы ($n=12$) получали воду без ТАА в аналогичном объеме. Животных рандомизировали на 4 группы ($n=12$ в каждой) в зависимости от длительности воздействия ТАА: 3, 5, 7, 9 нед. Дизайн эксперимента был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными при учреждении образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (протокол № 6 от 03.01.2019 г). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с рекомендациями Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях от 18.03.1986, Директиве Совета ЕЭС от 24.11.1986 и рекомендациям FELASA Working Group Report (1994-1996).

Для выявления соединительной ткани срезы печени окрашивали по методу Маллори. Гистологические препараты исследовали с использованием компьютерных программ ImageScope Color и cellSens Standard на базе микроскопа Olympus BX51 (Япония). Степень фиброза определяли с использованием полуколичественной шкалы K.G. Ishak. Уровень мРНК *notch1*, *notch2*, *yap1*, *tweek (tnfsf12)*, *fn14 (tnfrsf12a)*, *ang*, *vegfa*, *cxcl12 (sdf)*, *nos2* и *mmp-9* в печени выявляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Экспериментальная модель и оценка уровня экспрессии мРНК генов детально представлен в исследованиях Лебедевой Е.И. и соавт, 2023 [7]. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы IBM SPSS Statistics 23.0 (An IBM Company, 28.0.1, США). Изучение взаимосвязи между исследуемыми переменными проводили с помощью факторного анализа, в качестве критерия успешного завершения факторного анализа использовали показатель меры адекватности выборки Кайзера-Майера-Олкина ($KMO \geq 0,5$), коэффициенты корреляции выше 0,499 и ниже -0,499. Для выявления статистически значимых отличий между уровнем мРНК генов-мишеней использовали критерий Манна-Уитни.

Результаты. Уровень мРНК всех генов-мишеней статистически значимо изменился во всех контрольных точках (0 нед./3 нед., 0 нед./5 нед. и т.д. 3 нед./5 нед., 3 нед./7 нед. и т.д.). Однако изменения носили разный характер. Уровень

мРНК большинства генов-мишеней: *tweak (tnfsf12)*, *notch1*, *yap1*, *vegfa* и *cxcl12 (sdf)* снизился менее чем на порядок. В то время как в случае гена *ang* зафиксировано снижение в 10 и более раз по сравнению с контрольной точкой 0 нед. Четыре мишени показали рост уровня мРНК, из них три (*mmp-9*, *nos2*, *notch2*) в пределах 2 раз и один – *fn14 (tnfrsf12a)* более чем в 5 раз по сравнению с контрольной точкой 0 нед. соответственно. Результаты факторного анализа позволили выделить несколько групп генов в каждой контрольной точке.

В контрольной точке 0 нед. (морфологически не изменённая ткань печени) выявлено 4 фактора: первый – *tweak (tnfsf12)*, *notch1*, *yap1* и *cxcl12 (sdf)*, второй – *mmp-9* и *notch2*, третий – *ang* и *vegfa*, четвертый – *nos2* и *fn14*.

На 3 неделе эксперимента выявили умеренное формирование фиброзной соединительной ткани в портальных зонах – стадия фиброза F1. Наблюдалось перераспределение генов по факторам. Число факторов сократилось до 3. В состав первого фактора добавился *fn14* (рецептор *tweak*), при этом уровень его мРНК увеличился в 5 раз на фоне снижения уровня мРНК лиганда *tweak* на 40%. Второй фактор – *ang* и *vegfa*, снижение уровня обеих мишеней в пределах 5 раз. Третий фактор вобрал в себя все остальные мишени *mmp-9*, *notch2* и *nos2*.

На 5 неделе эксперимента в паренхиме печени установили портальный, мостовидный, местами центрлобулярный и диффузный перицеллюлярный фиброз со степенью F2/F3. При этом снова наблюдается перегруппировка генов-мишеней по факторам. Сохраняется их общее число – 3 фактора. В составе первого на этом этапе остаются *notch1*, *yap1* и *cxcl12 (sdf)*, при этом добавляются *ang* и *vegfa*. В свою очередь *fn14* и *tweak* формируют третий фактор. Второй фактор – повторяет третий из предыдущей контрольной точки (3 нед). В его составе *mmp-9*, *notch2* и *nos2*.

На 7 неделе эксперимента (степень фиброза F3/F4) сохраняется принцип организации первого фактора *notch1*, *yap1* и *cxcl12 (sdf)*, однако в его состав снова входит *tweak*. Мишени *ang* и *vegfa* формируют 4 фактор, *notch2* и *nos2* третий. Интересно, что на этом этапе в отдельный второй фактор выделены *mmp-9* и *fn14*.

На 9 неделе эксперимента в области отдельных портальных зон наблюдали единичные ложные печеночные дольки, формирование которых отражает начало процесса трансформация фиброза печени в цирроз F4/F5. Сформировано только два фактора. При этом в составе первого наконец наблюдается объединение сигнального пути *notch (notch1, notch2, yap1)*, а также *tweak/Fn14*.

В ответ на повреждения в печени запускаются процессы регенерации. Известно, что удаление поврежденных клеток, их компонентов и белков внеклеточного матрикса является необходимым этапом восстановления и сопровождает процесс, вплоть до его завершения. По мере образования зон

некроза после токсического поражения, освобождается ряд цитокинов и иных биологически активных регуляторных молекул способных привлекать клетки иммунной системы и, в частности, нейтрофилы. Они в свою очередь выделяют во внеклеточное пространство большое количества белков семейства матриксных металлопротеиназ – ММП. Мателлопротеиназы разрушают как белки внеклеточного матрикса, так и белки внутри самих клеток, тем самым активно вовлекаясь в регуляцию регенерации. Параллельно может нарастать воспаление, что привлекает еще большее количество клеток иммунной системы к очагам поражения. По мере обеспечения требуемых условий и подготовки соответствующих ниш, становится возможным дифференцировка клеток-предшественников и формирование новых гепатоцитов и клеток эндотелия сосудов. На этом этапе организму сложно обеспечивать баланс (синтез/деградация) белков внеклеточного матрикса, что приводит к прогрессированию фиброза [8].

Проведенный нами анализ факторов динамики уровня мРНК генов, связанных с процессами ангиогенеза, дифференцировки и миграции клеток, развития воспаления, разрушения белков внеклеточного матрикса и пр. показал, что со стороны молекулярно-генетических событий фиброгенез не является однородным или линейным и одни и те же молекулярные мишени в зависимости от стадии фиброза могут вовлекаться в различные процессы, что в большинстве случаев не отражается на уровне морфологических изменений.

Таким образом, для понимания молекулярных и клеточных механизмов инициации и развития фиброза требуется проведение дополнительных исследований с обязательным подробным рассмотрением всех стадий процесса.

Список литературы

1. Duan JL, Ruan B, Yan XC, Liang L, Song P, Yang ZY, Liu Y, Dou KF, Han H, Wang L. Endothelial Notch activation reshapes the angiocrine of sinusoidal endothelia to aggravate liver fibrosis and blunt regeneration in mice. *Hepatology*. 2018 Aug;68(2):677-690. doi: 10.1002/hep.29834. Epub 2018 Apr 26. PMID: 29420858; PMCID: PMC6099357.PMID: 29420858
2. Wilhelm A, Shepherd EL, Amatucci A, Munir M, Reynolds G, Humphreys E, Resheq Y, Adams DH, Hübscher S, Burkly LC, Weston CJ, Afford SC. Interaction of TWEAK with Fn14 leads to the progression of fibrotic liver disease by directly modulating hepatic stellate cell proliferation. *J Pathol*. 2016 May;239(1):109-21. doi: 10.1002/path.4707. Epub 2016 Mar 29. PMID: 26924336; PMCID: PMC4949530.
3. Tsomidis I, Notas G, Xidakis C, Voumvouraki A, Samonakis DN, Koulentaki M, Kouroumalis E. Enzymes of Fibrosis in Chronic Liver Disease.

Biomedicines. 2022 Dec 8;10(12):3179. doi: 10.3390/biomedicines10123179. PMID: 36551935; PMCID: PMC9776355.

4. Cai C, Zeng D, Gao Q, Ma L, Zeng B, Zhou Y, Wang H. Decreased ferroportin in hepatocytes promotes macrophages polarize towards an M2-like phenotype and liver fibrosis. *Sci Rep.* 2021 Jun 28;11(1):13386. doi: 10.1038/s41598-021-92839-z. PMID: 34183746; PMCID: PMC8239022.

5. Manco M, Panera N, Crudele A, Braghini MR, Bianchi M, Comparcola D, De Vito R, Maggiore G, Alisi A. Angiotensin-2 levels correlates with disease activity in children with nonalcoholic fatty liver disease. *Pediatr Res.* 2022 Jun;91(7):1781-1786. doi: 10.1038/s41390-021-01666-5. Epub 2021 Jul 30. PMID: 34331020.

6. Wu X, Qian L, Zhao H, Lei W, Liu Y, Xu X, Li J, Yang Z, Wang D, Zhang Y, Zhang Y, Tang R, Yang Y, Tian Y. CXCL12/CXCR4: An amazing challenge and opportunity in the fight against fibrosis. *Ageing Res Rev.* 2023 Jan;83:101809. doi: 10.1016/j.arr.2022.101809. Epub 2022 Nov 25. PMID: 36442720.

7. Lebedeva EI, Babenka AS, Shchastniy AT. *liveramp-9* mRNA Expression and Bridging Fibrosis Progression in Toxic Liver Injury. *Acta Naturae.* 2023 Apr-Jun;15(2):50-58. doi: 10.32607/actanaturae.17856. PMID: 37538808; PMCID: PMC10395773.

8. Morsy MA, Abdel-Gaber SA, Mokhemer SA, Kandeel M, Sedik WF, Nair AB, Venugopala KN, Khalil HE, Al-Dhubiab BE, Mohamed MZ. Pregnenolone Inhibits Doxorubicin-Induced Cardiac Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis-Role of Matrix Metalloproteinase 2 and NADPH Oxidase 1. *Pharmaceuticals (Basel).* 2023 Apr 28;16(5):665. doi: 10.3390/ph16050665. PMID: 37242448; PMCID: PMC10223417.