

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc622891>

Динамика уровня микроРНК, связанных с патологическим венозным ангиогенезом, при экспериментальном токсическом фиброзе печени крыс

Е.И. Лебедева¹, А.С. Бабенко², А.Т. Щастный¹¹ Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Витебск, Республика Беларусь;² Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

АННОТАЦИЯ

Обоснование. На текущий момент имеются сведения, демонстрирующие ключевое значение микроРНК в фиброгенезе печени, однако использование их в качестве мишеней для ранней диагностики, оценки и прогнозирования фиброза далеко от применения в клинической практике. Ключевую роль в генезе данного патологического процесса отводят ангиогенезу и капилляризации синусоидов, предполагая, что эти морфологические изменения определяют его патогенез и прогноз. Однако исследования в отношении роли микроРНК в патологическом ангиогенезе и капилляризации синусоидов немногочисленны.

Цель исследования — изучить динамику уровня микроРНК и мРНК молекулярных мишеней, ассоциированных с патологическим ангиогенезом на фоне токсического фиброза печени; оценить взаимосвязь выбранных молекулярно-генетических показателей с процессами перестройки внутрипечёночного сосудистого русла.

Методы. Фиброз и цирроз печени у крыс-самцов линии Wistar индуцировали свежеприготовленным раствором тиоацетамида в течение 17 нед. Уровень микроРНК-19a-3p, микроРНК-29b-3p, микроРНК-29b-1-5p, микроРНК-34b-5p, микроРНК-125b-5p, микроРНК-130a-5p, микроРНК-195-5p, микроРНК-449a-5p, микроРНК-449c-5p, микроРНК-466d, микроРНК-489-3p, микроРНК-495, микроРНК-664-3p, микроРНК-3085, микроРНК-3558-3p в печени определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты. Установлено, что на протяжении всего эксперимента относительный уровень микроРНК варьировал в широком диапазоне значений (10^{-3} – 10^4 отн. ед.). В большинстве случаев он снижался в точке перехода фиброза в цирроз, при этом рост наблюдали только для микроРНК-29b-3p. Между уровнем микроРНК и количеством междольковых вен, междольковых артерий, синусоидов, площадью соединительной ткани установлены статистически значимые корреляционные связи ($p < 0,05$).

Заключение. Совместный анализ морфологических и молекулярно-генетических показателей позволил предположить, что в рамках настоящей экспериментальной модели фиброза и цирроза печени перестройка внутрипечёночного сосудистого русла и прогрессирование фиброза связаны с динамикой уровня ряда исследованных нами микроРНК и мРНК *Ang*.

Ключевые слова: крысы; фиброгенез печени; морфология; патологический ангиогенез; экспрессия мРНК; экспрессия микроРНК.

Как цитировать:

Лебедева Е.И., Бабенко А.С., Щастный А.Т. Динамика уровня микроРНК, связанных с патологическим венозным ангиогенезом, при экспериментальном токсическом фиброзе печени крыс // Гены и клетки. 2024. Т. 19, № 1. С. 181–199. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc622891>

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc622891>

The dynamics of microRNAs level associated with pathological venous angiogenesis in experimental toxic liver fibrosis in rats

Elena I. Lebedeva¹, Andrei S. Babenka², Anatoly T. Shchastniy¹

¹ Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus;

² Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

ABSTRACT

BACKGROUND: It is known that miRNAs are important in liver fibrogenesis. However, their use as targets for early diagnosis and treatment of fibrosis is far from use in clinical practice. Angiogenesis and sinusoid capillarization are important histological features of the process. Studies regarding the role of miRNAs in pathological angiogenesis and sinusoid capillarization are insufficient.

AIM: To study the molecular targets (miRNAs and mRNAs) dynamics of associated with pathological angiogenesis in toxic fibrosis of the liver; to evaluate the relationship of the selected molecular factors to the processes of restructuring the intrahepatic vascular system.

METHODS: Fibrosis and subsequent cirrhosis of the liver in rats of the Wistar line (males) were induced for 17 weeks by a freshly prepared solution of thioacetamide. The level of miRNA-19a-3p, miRNA-29b-3p, miRNA-29b-1-5p, miRNA-34b-5p, miRNA-125b-5p, miRNA-130a-5p, miRNA-195-5p, miRNA-449a-5p, miRNA-449c-5p, miRNA-466d, miRNA-489-3p, miRNA-495, miRNA-664-3p, miRNA-3085, miRNA-3558-3p in fresh frozen liver samples, was determined by Two-tailed RT-qPCR.

RESULTS: In this study, we found that throughout the experiment, the relative level of microRNAs varied in a wide range of values (10^{-3} – 10^4 rel. units). In most cases, it decreased at the point of transition from fibrosis to cirrhosis, while growth was observed only for microRNA-29b-3p. Statistically significant correlation relationships were established between microRNAs and the number of interlobular veins, interlobular arteries, sinusoids, and the area of connective tissue ($p < 0.05$).

CONCLUSION: A joint analysis of morphological and molecular-genetic parameters allowed us to suggest that within the framework of the current experimental model of liver fibrosis and cirrhosis, the restructuring of the intrahepatic vascular bed and the progression of fibrosis are associated with the dynamics of the level of a number of microRNAs that we studied and *Ang* mRNA level.

Keywords: rats; liver fibrosis; morphology; angiogenesis; mRNA expression; microRNA (miRNA) expression.

To cite this article:

Lebedeva EI, Babenka AS, Shchastniy AT. The dynamics of microRNAs level associated with pathological venous angiogenesis in experimental toxic liver fibrosis in rats. *Genes & cells*. 2024;19(1):181–199. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc622891>

ВВЕДЕНИЕ

Фиброз печени сопровождается патологическим ангиогенезом, но его фундаментальные основы до конца не изучены и до сих пор остаются в центре внимания учёных. Физиологический ангиогенез жизненно необходим в процессах развития, роста, регенерации тканей и органов, а патологический вызывает аномальный рост сосудов и способствует патогенезу различных заболеваний [1]. Ключевую роль в прогрессировании фиброза печени отводят патологическому ангиогенезу и капилляризации синусоидов, предполагая, что эти морфологические процессы определяют его патогенез и прогноз. К сожалению, до сих пор при изучении фиброгенеза печени главной проблемой остаётся понимание молекулярно-генетических механизмов патологического ангиогенеза [2–4].

Принято считать, что ключевым моментом, запускающим формирование новых кровеносных сосудов, является гипоксия [5, 6]. Эндотелиоциты (ECs) весьма чувствительны к состоянию гипоксии и способны экспрессировать факторы, индуцируемые гипоксией (HIF-1 α , HIF-2 α). Их повышенный уровень может активировать более 60 генов-мишеней. Большая часть этих генов прямо или косвенно участвуют в ангиогенезе. Семейство фактора роста эндотелия сосудов (VEGFs), ангиопоэтины (Ang-1, Ang-2), семейство факторов роста фибробластов (FGFs), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), плацентарный фактор роста (PlGF), трансформирующий фактор роста (TGF- β) и другие являются индукторами патологического ангиогенеза. Хемокин CXCL12 посредством связывания с рецептором (CXCR4) активирует ряд сигнальных путей, которые отвечают за пролиферацию, миграцию ECs и их адгезию [7–10]. К настоящему времени раскрыть достаточное количество деталей о функционировании CXCL12 при патологическом ангиогенезе не удалось.

На сегодняшний день считается, что повреждение гепатоцитов играет решающую роль в инициировании фиброза печени. Печёночные клетки в состоянии повреждения выделяют воспалительные и фиброгенные цитокины, а также молекулы семейства DAMPs, которые посылают сигналы «опасности» окружающим клеткам. В экспериментальных исследованиях выявлено, что клетки Купфера через Toll-подобные рецепторы (TLR1, TLR2, TLR3 и TLR4) поглощают остатки погибающих гепатоцитов и активируются в M1-фенотип (классически активированные макрофаги). M1-фенотип клеток Купфера характеризуется повышенной экспрессией провоспалительных цитокинов, фактора некроза опухоли альфа, интерферона гамма, индуцибельной NO-синтетазы, активных форм кислорода. Эти вещества стимулируют реакцию воспаления и индуцируют экспрессию мРНК как отдельных генов, так и ряда сигнальных путей (TWEAK/Fn14, Notch, Wnt). Это способствует

процессам активации, пролиферации, дифференцировки стеллатных клеток (HSCs), порталных фибробластов, бипотентных малодифференцированных и мультипотентных стволовых клеток желчных протоков [11–13].

В работах, опубликованных нами ранее, представлены сведения о перестройке внутрипечёночного сосудистого русла и об изменении уровня мРНК *Ang*, *Vegfa* и *Cxcl12* (*Sdf*) [14, 15]. Для более глубокого понимания взаимосвязи молекулярно-генетических маркёров и регуляции ангиогенеза в условиях токсического фиброза мы обратили внимание на необходимость продолжения исследований уровня микроРНК, ассоциированных с изучаемыми генами-мишенями. Основываясь на анализе литературных источников по возможным взаимодействиям между микроРНК и генами *Ang*, *Vegfa*, а также процессами патологического ангиогенеза, мы отобрали микроРНК-19a-3p, микроРНК-29b-3p, микроРНК-29b-1-5p, микроРНК-34b-5p, микроРНК-125b-5p, микроРНК-130a-5p, микроРНК-195-5p, микроРНК-449a-5p, микроРНК-449c-5p, микроРНК-466d, микроРНК-489-3p, микроРНК-495, микроРНК-664-3p, микроРНК-3085, микроРНК-3558-3p.

На текущий момент известно, что микроРНК (microRNA, miRNA) принимают участие в регуляции экспрессии генов и связаны с процессами, способствующими возникновению ряда заболеваний у человека [16, 17]. Из-за высокой стабильности в биологических жидкостях циркулирующие микроРНК рассматривают как перспективные малоинвазивные диагностические и прогностические маркёры [18, 19]. Предполагаем, что комплексный анализ микроРНК, генов-мишеней и гистологических маркёров ангиогенеза позволит установить их совместное участие в формировании патологических сосудов на различных стадиях фиброза. Это в дальнейшем расширит представления о регуляции ангиогенеза при фиброзе и, возможно, поспособствует обнаружению новых потенциальных молекулярных маркёров для диагностики и стадирования фиброза, а также молекулярных мишеней для целевой персонализированной терапии.

Цель исследования — изучить динамику уровня микроРНК и мРНК молекулярных мишеней, ассоциированных с патологическим ангиогенезом на фоне токсического фиброза печени; оценить взаимосвязь выбранных молекулярно-генетических показателей с процессами перестройки внутрипечёночного сосудистого русла.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование

Дизайн исследования был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными при Витебском государственном ордена Дружбы народов медицинском университете (протокол № 13 от 31.03.22). Все манипуляции

с животными проводили в соответствии с рекомендациями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18.03.1986), с Директивой Совета ЕЭС от 24.11.1986 и рекомендациями FELASA Working Group Report (1994–1996).

Фиброз и цирроз печени у крыс-самцов линии Wistar индуцировали свежеприготовленным раствором тиоацетамида (ТАА; Acros Organics, США), который вводили интрагастрально через зонд в дозе 200 мг/кг массы тела 2 раза в неделю в течение 17 нед. Крысы контрольной группы ($n=12$) получали воду без ТАА в аналогичном объёме. Животных рандомизировали на 8 экспериментальных групп ($n=12$ в каждой): 3 нед (1-я группа), 5 нед (2-я группа), 7 нед (3-я группа), 9 нед (4-я группа), 11 нед (5-я группа), 13 нед (6-я группа), 15 нед (7-я группа), 17 нед (8-я группа) — и выводили из эксперимента согласно разделению. Сразу после декапитации из большой левой доли печени крыс скальпелем забирали фрагменты органа диаметром не более 5 мм. Работу проводили при температуре +20 °C с жёстким соблюдением временных интервалов — манипуляции с одним животным в пределах 100–140 с. После забора образцы помещали в криобирки (Cry Tube 5,0 мл; GenFollower, Китай) и далее — в жидкий азот для хранения до начала последующей процедуры выделения микроРНК.

Гистологическое, иммуногистохимическое и морфометрическое исследование

Образцы биологического материала диаметром 5–10 мм помещали в 10% раствор нейтрального формалина («Биовитрум», Россия) на фосфатном буфере и фиксировали в течение 24 ч. Затем проводили обработку фиксированного материала с последующей заливкой в парафин, используя автомат для гистологической обработки ткани STP-120 (Thermo Fisher Scientific, США) и станции для заливки ткани парафином EC350 (Thermo Fisher Scientific, США). От каждого животного получали по одному блоку для каждого метода окрашивания, с помощью микротомы HM 340E (Thermo Scientific, США) готовили в среднем по 3–4 среза толщиной 4 мкм и помещали их на предметные стёкла. Для получения обзорных гистологических препаратов срезы печени окрашивали гематоксилином и эозином, а для выявления соединительной ткани — по Маллори с помощью автомата для окраски HMS 70 (Thermo Scientific, США).

Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах. Использовали моноклональные мышиные антитела CK19 (маркёр билиарных стволовых клеток печени, номер в каталоге E-AB-70231, разведение 1:1000), моноклональные мышиные антитела CD31 (маркёр эндотелиальных клеток, номер в каталоге E-AB-70173, разведение 1:500) в соответствии с инструкциями производителей. В работе применяли антитела производства Wuman Elabscience Biotechnology Incorporated

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

Гистологические препараты исследовали с использованием компьютерных программ ImageScope Color и cellSens Standard. Определяли площадь соединительной ткани и площадь экспрессии маркёров CD31 и CK19 в процентах к площади изображения без учёта степени экспрессии маркёров. Измерения осуществляли путём микроскопической съёмки случайных полей зрения препаратов цифровой камерой OLYMPUS XC30 (Olympus, Япония) на базе микроскопа Olympus BX51 (Olympus, Япония) при увеличении объектива 20×. Подсчитывали количество междольковых артерий, междольковых вен и синусоидных капилляров. Степень фиброза определяли с использованием полуколичественной шкалы K.G. Ishak. Гистологическое, иммуногистохимическое, морфометрическое исследование и оценка экспрессии мРНК генов подробно описаны в статьях [14, 15].

Формирование панели целевых микроРНК

Выбор целевых микроРНК осуществляли на основании информации, размещённой в открытой онлайн-базе данных miRDB (<https://mirdb.org/>) [20]. Критерии включения микроРНК в исследование: связь с функцией генами-мишенями; минимальное значение показателя Target Rank; максимальное значение показателя Target Score (в сумме увеличивает вероятностью того, что ген-мишень является мишенью для микроРНК) на основании алгоритма MirTarget с использованием данных высокопроизводительного секвенирования. Предпочтение также отдавали тем микроРНК, которые связаны с несколькими генами-мишенями (табл. 1).

Определение уровня микроРНК методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Выделение микроРНК осуществляли с помощью набора NucleoSpin miRNA (MACHEREY-NAGEL, Германия) согласно инструкции производителя. Количество суммарной РНК после выделения определяли с помощью спектрофотометрии (длина волны — 260 нм,

Таблица 1. Перечень микроРНК, включённых в исследование, гены-мишени микроРНК**Table 1.** List of microRNAs included in the study, target microRNAs

МикроРНК	Гены-мишени								
	<i>Yap1</i>	<i>Tweak</i>	<i>Fn14</i>	<i>Mmp-9</i>	<i>Notch1</i>	<i>Cxcl12</i>	<i>Notch2</i>	<i>Vegfa</i>	<i>Ang</i>
МикроРНК-3085	■					■			
МикроРНК-3558-3р					■				
МикроРНК-130а-5р		■						■	
МикроРНК-19а-3р			■						
МикроРНК-664-3р				■		■			
МикроРНК-449с-5р					■		■	■	
МикроРНК-34b-5р					■		■	■	
МикроРНК-449а-5р					■		■	■	
МикроРНК-466d						■		■	
МикроРНК-495							■	■	
МикроРНК-29b-1-5р					■		■		■
МикроРНК-195-5р								■	
МикроРНК-489-3р							■	■	
МикроРНК-29b-3р							■	■	
МикроРНК-125b-5р				■	■	■			

спектрофотометр Specord 250 (Analytic Jena, Германия). Для каждого образца снимали спектр поглощения 220–340 нм.

Для определения уровня микроРНК использовали способ, описанный в работе [21]. Синтез кДНК проводили с помощью набора реагентов для обратной транскрипции ArtMMLV Total («АртБиоТех», Беларусь).

В реакционную смесь вносили 10 нг суммарной РНК, температурный режим соответствовал стандартным требованиям и задавался в соответствии с инструкцией к набору для обратной транскрипции, за исключением замены dT праймера или случайных гексамеров на подобранные нами специфические олигонуклеотидные праймеры («Праймтех», Беларусь), представленные в табл. 2.

Таблица 2. Последовательности специфических олигонуклеотидных праймеров для проведения этапа двухконцевой обратной транскрипции**Table 2.** Sequences of specific oligonucleotide primers for the two-tailed reverse transcription step

№	Мишень	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'
1	mR3085_L	AGCAGCCAGACTATGCTCTGGTTGGCTCTGGTGCCAGGTCCGAGGTATTCGGCACCAGAGCCAACCTCTCCACTTGAGGGG
2	mR3558_L	CCTCCACAGTCTATGCTCTGGTTGGCTCTGGTGCCAGGTCCGAGGTATTCGGCACCAGAGCCAACCTCTCCACTTACATAG
3	mR130a_L	TGAAAAGAGCCTATGCTCTGGTTGGCTCTGGTGCCAGGTCCGAGGTATTCGGCACCAGAGCCAACCTCTCCACTTAGTAGC
4	mR19a_L	GATTTGCACACTATGCTCTGGTTGGCTCTGGTGCCAGGTCCGAGGTATTCGGCACCAGAGCCAACCTCTCCACTTTCAGTT
5	mR664_L	TAAATGAATACTATGCTCTGGTTGGCTCTGGTGCCAGGTCCGAGGTATTCGGCACCAGAGCCAACCTCTCCACTTTAGGCT
6	mR449c_L	TGGACTGCCTCTATGCTCTGGTTGGCTCTGGTGCCAGGTCCGAGGTATTCGGCACCAGAGCCAACCTCTCCACTTCCAGCT
7	mR34b_L	TACACTGCCTCTATGCTCTGGTTGGCTCTGGTGCCAGGTCCGAGGTATTCGGCACCAGAGCCAACCTCTCCACTTACAATC
8	mR449a_L	TACACTGCCACTATGCTCTGGTTGGCTCTGGTGCCAGGTCCGAGGTATTCGGCACCAGAGCCAACCTCTCCACTTACCAGC
9	mR466d_L	ACACACACATCTATGCTCTGGTTGGCTCTGGTGCCAGGTCCGAGGTATTCGGCACCAGAGCCAACCTCTCCACTTACAAA
10	mR495_L	ATGTTTGTCTATGCTCTGGTTGGCTCTGGTGCCAGGTCCGAGGTATTCGGCACCAGAGCCAACCTCTCCACTTAAAGAG
11	mR29b1_L	CCATATGAAACTATGCTCTGGTTGGCTCTGGTGCCAGGTCCGAGGTATTCGGCACCAGAGCCAACCTCTCCACTTAAATCT
12	mR195_L	TGTGCTGCTACTATGCTCTGGTTGGCTCTGGTGCCAGGTCCGAGGTATTCGGCACCAGAGCCAACCTCTCCACTTGCCAAAT
13	mR489_L	GTGATGTCATCTATGCTCTGGTTGGCTCTGGTGCCAGGTCCGAGGTATTCGGCACCAGAGCCAACCTCTCCACTTGTGCC
14	mR29b3_L	AATGGTGCTACTATGCTCTGGTTGGCTCTGGTGCCAGGTCCGAGGTATTCGGCACCAGAGCCAACCTCTCCACTTAAACT
15	mR125b_L	GTCTCAGGGACTATGCTCTGGTTGGCTCTGGTGCCAGGTCCGAGGTATTCGGCACCAGAGCCAACCTCTCCACTTTCACAA

Олигонуклеотидные праймеры и зонды для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) (краситель — SYBR Green I), выбранные с помощью бесплатного онлайн-приложения Primer3 v. 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), представлены в табл. 3.

Конечный объём реакционной смеси составлял 25 мкл и содержал все необходимые компоненты: 2 мМ хлорида магния, 0,1 мМ смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов

Таблица 3. Нуклеотидные последовательности специфических праймеров для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Table 3. Nucleotide sequences of specific primers for qPCR

№	Мишень	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'
2	mR3085_F	AGCAGCCAGACTATGCTCTG
3	mR3085_R	TGTGGCTGCTATGGCCC
5	mR3558_F	CCTCCACAGCTATGCTCT
6	mR3558_R	ACTGTGGAGGGTTTCTATGT
8	mR130a_F	TGAAAAGAGCCTATGCTCTGG
9	mR130a_R	GCTCTTTTCACATTGTGCTACT
11	mR19a_F	GATTTGCACACTATGCTCTGG
12	mR19a_R	TGTGCAAATCTATGCAAACTGA
14	mR664_F	TAAATGAATACTATGCTCTGGTTGG
15	mR664_R	TATTCATTTACTCCCCAGCCTA
17	mR449c_F	TGGACTGCCTCTATGCTCTGG
18	mR449c_R	AGGCAGTGCATTGCTAGCT
20	mR34b_F	TACACTGCCTCTATGCTCTGG
21	mR34b_R	AGGCAGTGAATTAGCTGATTGT
23	mR449a_F	TACACTGCCACTATGCTCTGG
24	mR449a_R	TGGCAGTGTATTGTTAGCTGGT
26	mR466d_F	ACACACACATCTATGCTCTG
27	mR466d_R	ATGTGTGTGTATGCTCTTTGT
29	mR495_F	ATGTTTGTCTATGCTCTGGTT
30	mR495_R	AAACAACATGGTGCACCTCTT
32	mR29b1_F	CCATATGAAACTATGCTCTGGT
33	mR29b1_R	ACTTTTTCATATGGTGGTTAGATTT
35	mR195_F	TGTGCTGCTACTATGCTCTG
36	mR195_R	TAGCAGCACAGAAATATTGGC
38	mR489_F	GTGATGTCATCTATGCTCTGG
39	mR489_R	ATGACATCACATATATGGCAGC
41	mR29b3_F	AATGGTGCTACTATGCTCTGG
42	mR29b3_R	TAGCACCATTTGAAATCAGTGT
44	mR125b_F	GTCTCAGGGACTATGCTCTGGT
45	mR125b_R	TCCCTGAGACCCTAACTTGTGA

(dNTP), 500 нМ каждого олигонуклеотида, 1,25 ед. термостабильной Taq-ДНК-полимеразы с соответствующим буферным раствором, а также 1× раствор Zubr Green I («Праймтех», Беларусь). Режим термоциклирования — +95 °С в течение 1 мин; затем 40 циклов по +95 °С в течение 5 с и +60 °С в течение 15 с. Детекция по каналу FAM/Sybr — после каждого цикла. В работе использовали прибор CFX96touch (Bio-Rad, США). После получения данных ПЦР-РВ проверяли вариации результатов для каждой мишени. Уровень ряда микроРНК отличался высокой стабильностью. В связи с этим одну из мишеней выбрали для нормализации (метод 2^{-ΔΔCt}) количественных данных ПЦР — микроРНК-34b-5p (ст. откл. — 0,24 цикла в среднем по триплету).

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета IBM SPSS Statistics v. 27.0.1.0 (IBM, США). Поскольку все исследуемые показатели характеризовались распределением, отличным от нормального, для характеристики выборки использовали непараметрические критерии (Манна-Уитни) и значения медианы и 1-го и 3-го квартилей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Патоморфологический анализ печени крыс Wistar в зависимости от стадий развития фиброза

В начале эксперимента (3 нед) при гистологическом исследовании печени в большинстве полей зрения выявили утолщение и разрастание фиброзной соединительной ткани вокруг портальных зон и реже — у центральных вен (портальный и центрлобулярный фиброз, F1, рис. 1, *a, b*).

Впоследствии при нарастании интоксикации у крыс (через 5 и 7 нед) отмечали обширные зоны из гепатоцитов в состоянии гидропической дистрофии. К этому времени уже сформировались мостовидные соединительнотканые септы, способствующие сближению соседних портальных зон (мостовидный фиброз, рис. 1, *c*). В отдельных фокусах определяли центрлобулярный и перицеллюлярный фиброз (рис. 1, *d*). Степень фиброза через 5 нед составила F2/F3, а через 7 нед — F3/F4.

По завершении 9-й недели эксперимента вблизи отдельных портальных триад начиналась узелковая трансформация паренхимы с формированием единичных ложных печёночных долек (F4/F5, рис. 1, *e*).

В последующем (11 нед, F5 — неполный цирроз, рис. 1, *f*) наблюдали диффузную узловую перестройку паренхимы печени, значительное разрастание соединительной ткани вокруг портальных зон и образование толстых фиброзных септ по периферии ложных печёночных долек.

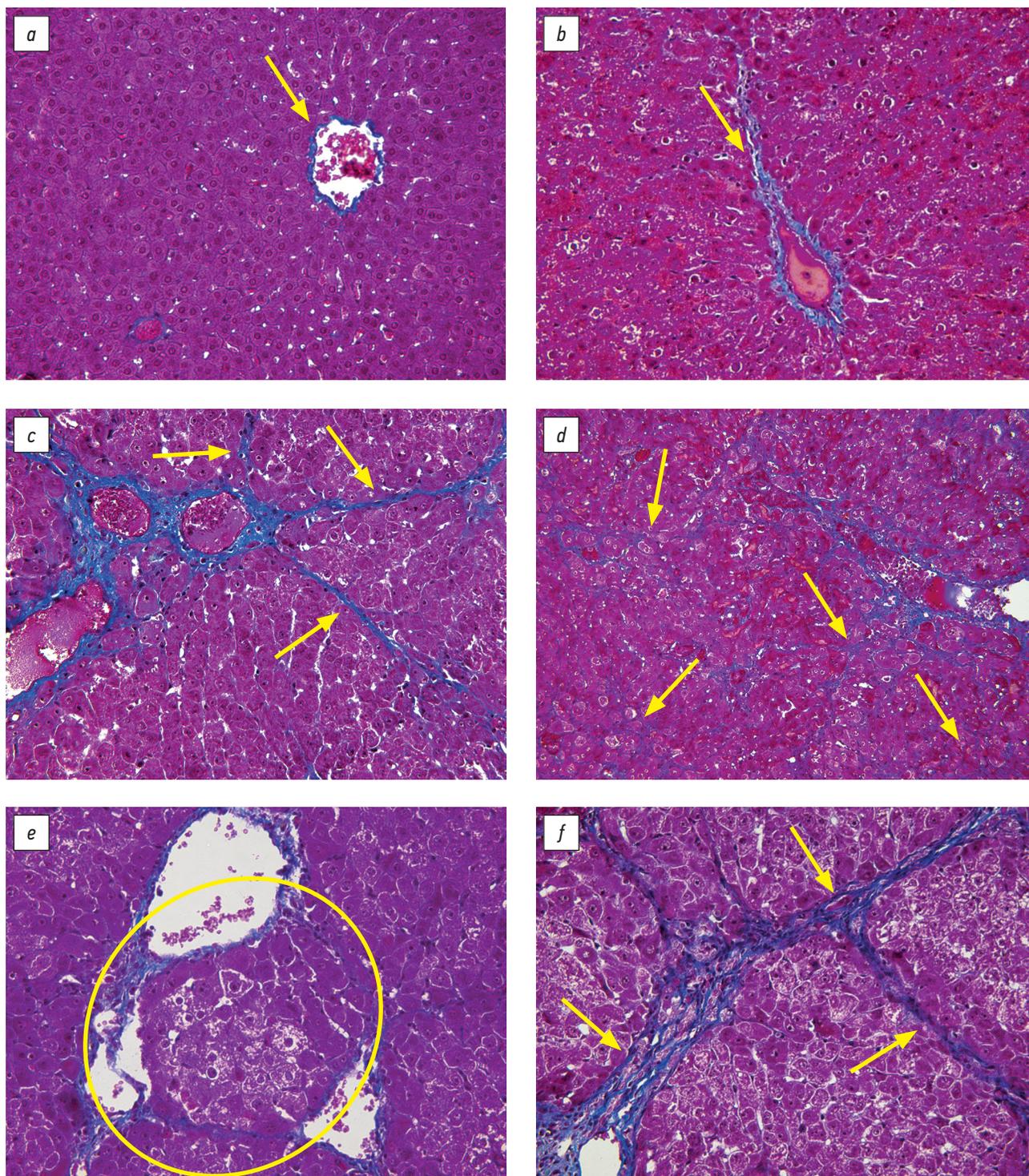


Рис. 1. Микрофотография гистологических препаратов печени крыс контрольной группы (a), через 3 (b), 5 (c), 7 (d), 9 (e), 11 (f), 13 (g), 15 (h, i), 17 (j) нед после начала эксперимента. Окраска по методу Маллори. Ув.: $\times 100$ (g, h, j); $\times 200$ (d, i); $\times 400$ (a, b, c, e, f); a — центральная вена (стрелка); b — неполная фиброзная соединительнотканная септа (стрелка); c — фиброзные соединительнотканые септы (стрелки); d — перипеллюлярный фиброз (стрелки); e — ложная печёночная долька (овальная рамка); f — толстые фиброзные соединительнотканые септы (стрелки); g, h — ложные печёночные дольки разного диаметра и формы, выраженный патологический ангиогенез (стрелки); i — желчные протоки (стрелки), протоковая реакция (овальная рамка); j — выраженная деструкция паренхимы.

Fig. 1. Histological preparations of rat liver, microphoto: control group (a), after 3 (b), 5 (c), 7 (d), 9 (e), 11 (f), 13 (g), 15 (h, i), 17 (j) weeks after the start of the experiment. Staining using the Mallory method. Mag.: $\times 100$ (g, h, j); $\times 200$ (d, i); $\times 400$ (a, b, c, e, f); a — central vein (arrow); b — incomplete fibrous connective tissue septa (arrow); c — fibrous connective tissue septa (arrows); d — pericellular fibrosis (arrows); e — false hepatic lobule (oval frame); f — thick fibrous connective tissue septa (arrows); g, h — false hepatic lobules of different diameters and shapes, pronounced pathological angiogenesis (arrows); and i — bile ducts (arrows), ductal reaction (oval frame); j — pronounced destruction of the parenchyma.

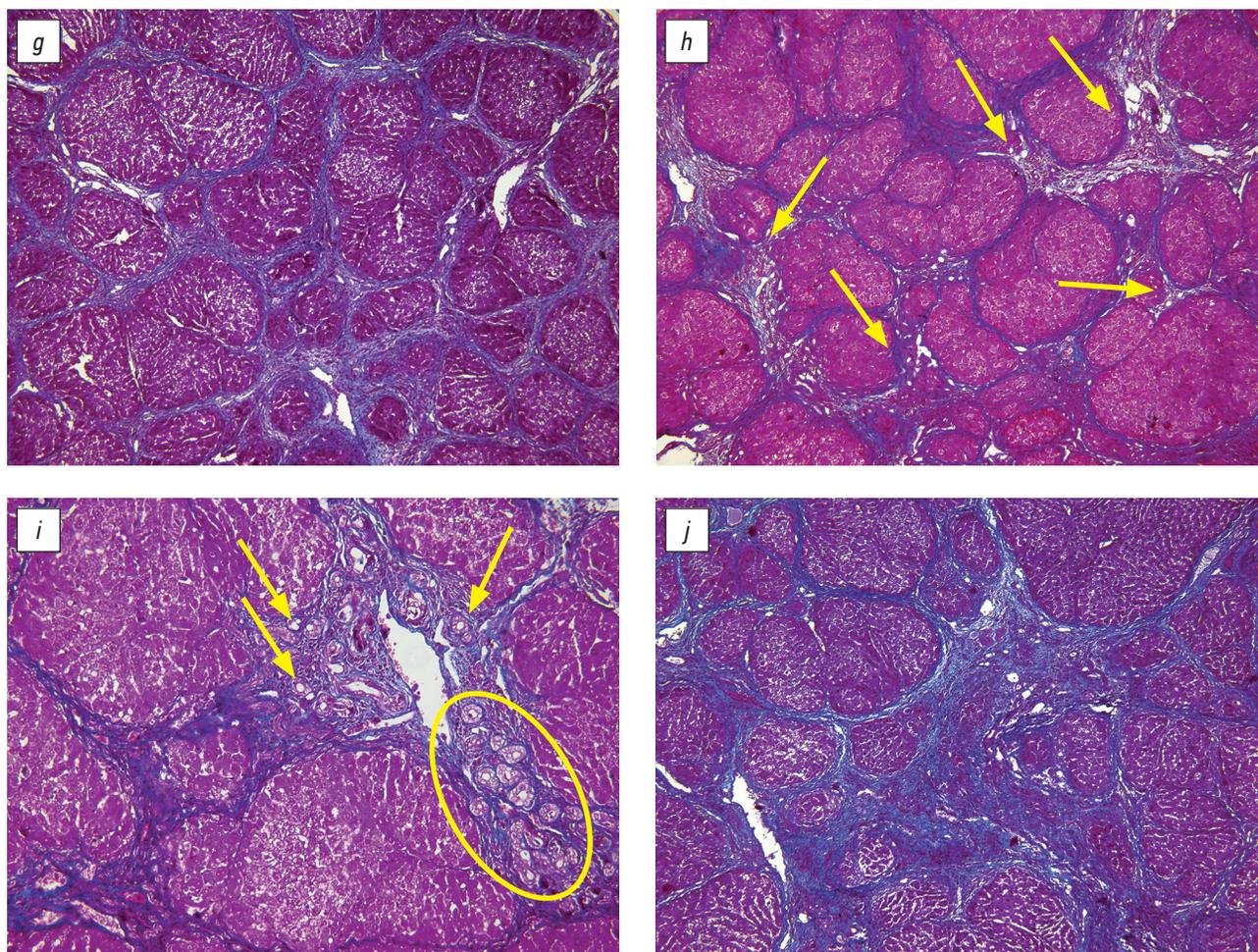


Рис. 1. Окончание.
Fig. 1. Ending.

По окончании 13-й недели эксперимента в паренхиме печени обнаружены крупноочаговый некроз гепатоцитов, очаговые кровоизлияния, нарушение пластинчатого строения и образование ложных печёночных долек разного размера и формы (F6 — полный цирроз, рис. 1, *g*).

Через 15 нед в образцах печени наблюдали выраженное нарушение гистоархитектоники паренхимы печени (рис. 1, *h*). В фиброзных соединительнотканых септах и в портальных зонах отмечали пролиферацию междольковых желчных протоков (протоковая реакция, рис. 1, *l*); в некоторых портальных областях насчитывалось более 30 поперечных сечений протоков.

По завершении эксперимента (17 нед) в печени крыс выявили крупноочаговый некроз гепатоцитов, в отдельных гистологических препаратах — тотальный некроз с полным нарушением пластинчатого строения долек, а также очаговые кровоизлияния в паренхиме (рис. 1, *j*). Толстые фиброзные септы включали очаговые лимфоидно-гистиоцитарные инфильтраты.

В портальных зонах и фиброзных септах обнаружен выраженный патологический ангиогенез. Он проявлялся формированием множества мелких кровеносных сосудов венозного типа: венул и мелких вен (см. рис. 1, *g, h*).

Принимая во внимание этот патологический процесс, параллельно определяли количество междольковых вен, синусоидных капилляров и междольковых артерий на различных стадиях фиброза печени. Результаты исследования показали изменение соотношения в сторону снижения количества синусоидных капилляров и увеличения числа междольковых вен. Прогрессирование фиброза с трансформацией его в цирроз сопровождалось статистически значимым увеличением площади клеток CD31⁺ в синусоидных капиллярах печени крыс и площади клеток СК19⁺ в портальных зонах и грубоволокнистых соединительнотканых септах [14, 15].

В холангиоцитах протоков и проточков печени контрольных крыс интенсивно экспрессировался билиарный маркер цитокератин СК19 (рис. 2, *a*). На протяжении всего эксперимента в фиброзных септах и портальных зонах в значительном количестве выявляли клетки СК19⁺, формирующие желчные протоки, клеточные тяжи и микродольки (рис. 2, *b–f*). В подавляющем большинстве тяжи из клеток СК19⁺ окружали ложные печёночные дольки по периферии, реже они находились в центре дольки (см. рис. 2, *e*). В перипортальных зонах и в крупных очагах некроза среди погибающих и некротизированных

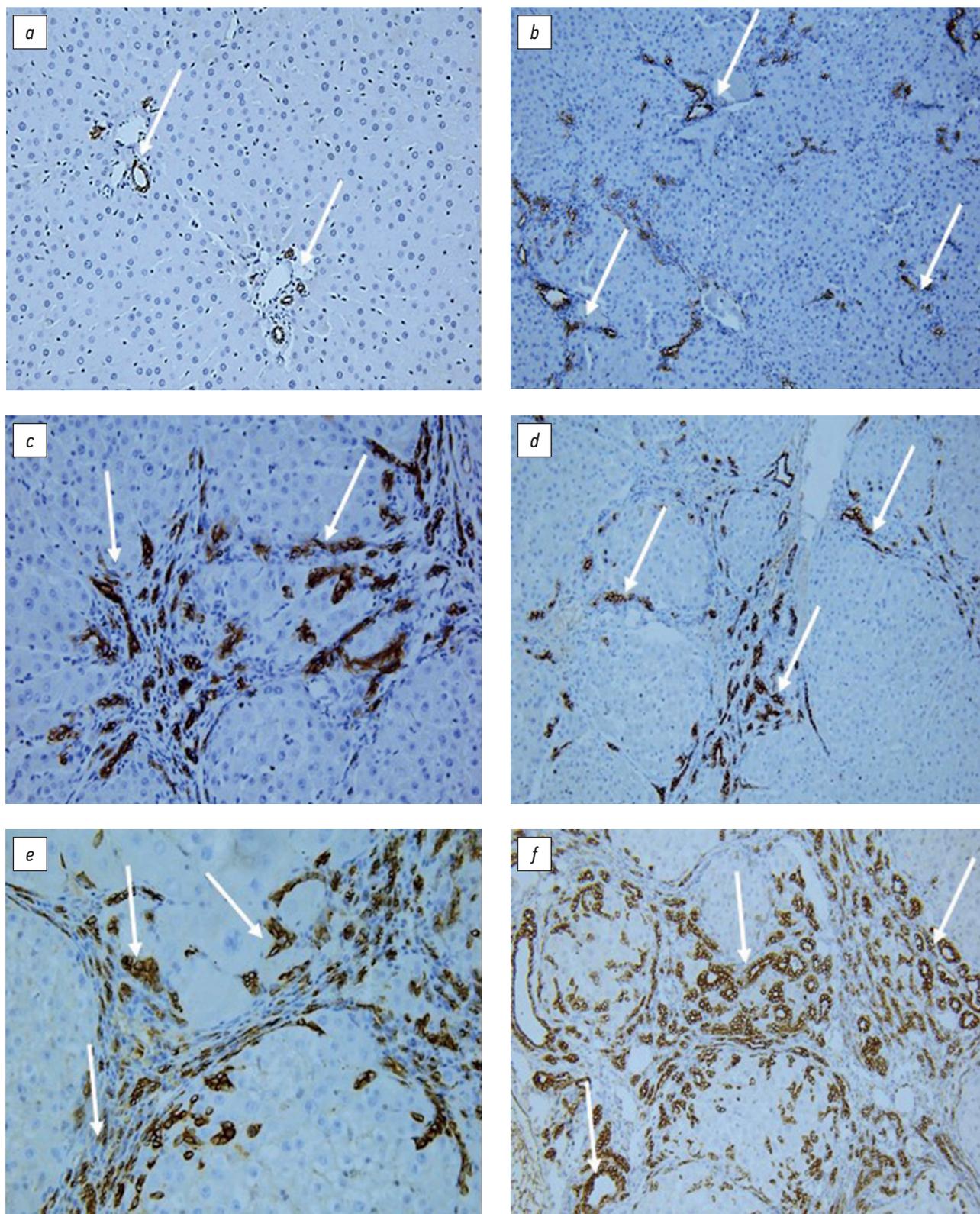


Рис. 2. Микрофотографии гистологических препаратов печени крыс контрольной группы (a), через 3 (b), 9 (c), 11 (d), 13 (g), 15 (e, h), 17 (f) нед после начала эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание на CK19, докраска гематоксилином Майера. Окраска по методу Маллори (h). Ув.: $\times 400$ (a, c, e, g, h), $\times 200$ (b, d, f); a–e — клетки CK19⁺ (стрелки), f — желчные протоки (стрелки), g — процесс формирования печёночной микродольки из клеток CK19⁺ (овальная рамка), h — новые печёночные микродольки (овальные рамки).

Fig. 2. Histological preparations of rat liver, microphoto: control group (a), in 3 (b), 9 (c), 11 (d), 13 (g), 15 (e, h), 17 (f) weeks after the start of the experiment. Immunohistochemical staining for CK19, counterstaining with Mayer's hematoxylin. Staining using the Mallory method (h). Mag.: $\times 400$ (a, c, e, g, h), $\times 200$ (b, d, f); a–e — CK19⁺ cells (arrows), f — bile ducts (arrows), g — process of formation of hepatic microlobules from CK19⁺ cells (oval frame), h — new hepatic microlobules (oval frames).

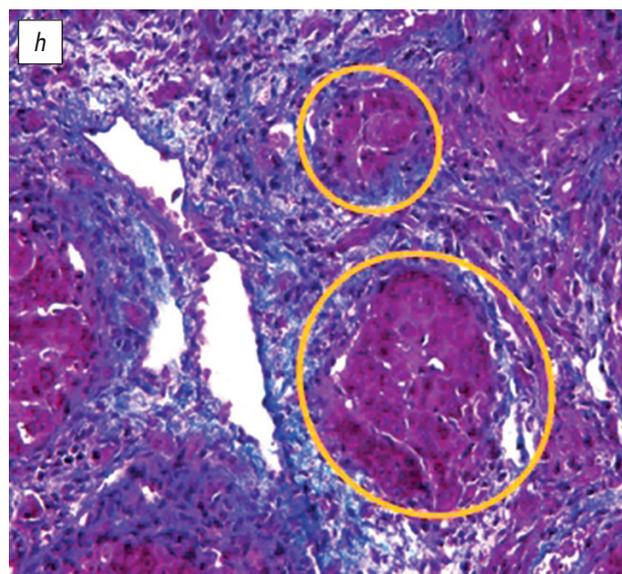
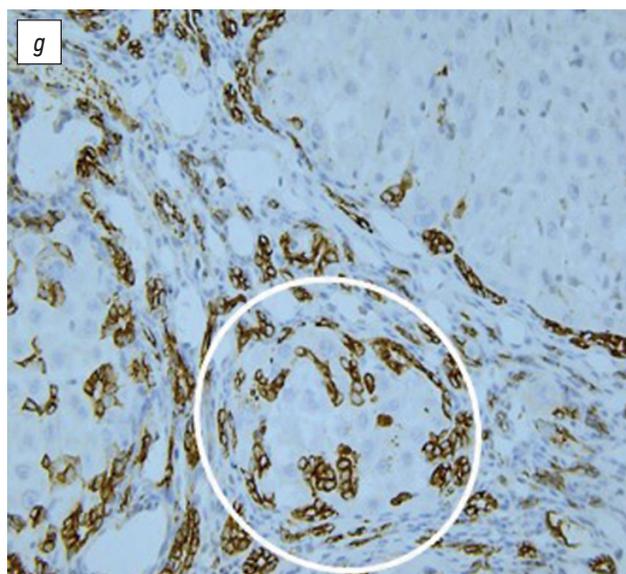


Рис. 2. Окончание.
Fig. 2. Ending.

гепатоцитов отмечали большие скопления клеток CK19⁺ (рис. 2, *g*). По всей видимости, в данных участках эти клетки активно формировали новую печёночную микродольку. На препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, а также по методу Маллори, цитоплазма гепатоцитов микродолек была интенсивно тёмной по сравнению с другими гепатоцитами (рис. 2, *h*).

В синусоидных капиллярах печени интактных животных маркер CD31 проявлял зональность. В центролобулярной и перипортальной зонах визуализировались клетки CD31⁺ с более интенсивной окраской, а в промежуточной зоне в отдельных местах наблюдалось снижение их экспрессии с полным отсутствием иммуногистохимической реакции (рис. 3, *a*). Прогрессирование фиброза с трансформацией его в цирроз сопровождалось увеличением площади клеток CD31⁺ в синусоидных капиллярах печени крыс (рис. 3, *b–f*). В большинстве ложных печёночных долек синусоиды имели вид выраженной густой сети. Вместе с этим имелись дольки, в отдельных участках которых клетки CD31⁺ совсем не определяли. На рис. 4 и 5 представлено изменение площади клеток CD31⁺ и CK19⁺ на разных этапах исследования.

Динамика уровня микроРНК

Относительный уровень микроРНК варьировал в широком диапазоне значений (10^{-3} – 10^4 отн. ед.). На рис. 6 представлено графическое отображение его динамики для всех мишеней, включённых в исследование.

Согласно данным морфологического исследования, на 9-й неделе эксперимента зафиксирован переход фиброза в цирроз. Вне зависимости от того, в каком диапазоне значений варьировал уровень микроРНК, в большинстве случаев он снижался в точке перехода. Рост наблюдали только в случае микроРНК-29b-3p. На протяжении всего эксперимента уровень микроРНК

изменялся по-разному. В целом микроРНК-130a-5p, микроРНК-495, микроРНК-466d, микроРНК-125b-5p, микроРНК-29b-1-5p и микроРНК-19a-3p продемонстрировали увеличение относительного уровня, не превышающее 80% от значений контрольной точки. При этом микроРНК-449a-5p, микроРНК-449c-5p и микроРНК-29b-3p характеризовались изменениями уровня в более широком диапазоне, включающем снижение порядка 40% и рост в пределах 50% по сравнению с контрольной точкой без выраженного однонаправленного вектора на протяжении всех этапов эксперимента. Ряд мишеней показал изменения относительного уровня в два и более раза: микроРНК-195-5p, микроРНК-664-3p, микроРНК-489-3p, микроРНК-3085 и микроРНК-3558-3p. Различия между уровнем микроРНК во всех контрольных точках по сравнению с начальным представлены в табл. 4.

Динамика уровня микроРНК-3085 не была статистически значимой по сравнению с базовым уровнем (0 нед) ни в одной контрольной точке, а уровня микроРНК-449a-5p и микроРНК-29b-3p — только в последней контрольной точке на терминальных стадиях цирроза. Целый ряд мишеней показал статистически значимые отличия в шести и более контрольных точках (микроРНК-3558-3p, микроРНК-195-5p, микроРНК-466d, микроРНК-19a-3p, микроРНК-664-3p, микроРНК-489-3p).

На рис. 7 отражены количественные изменения морфологических (площадь соединительной ткани, количество артерий, вен и синусоидов), иммуногистохимических (количество клеток CK19⁺ и CD31⁺), молекулярно-генетических (мРНК генов *Ang* и *Vegfa*; микроРНК, показавшие динамику относительного уровня более чем в 2 раза и статистически значимо изменившие свой уровень в шести и более контрольных точках по сравнению с началом эксперимента) показателей. Для облегчения визуализации значения относительного уровня *Ang*

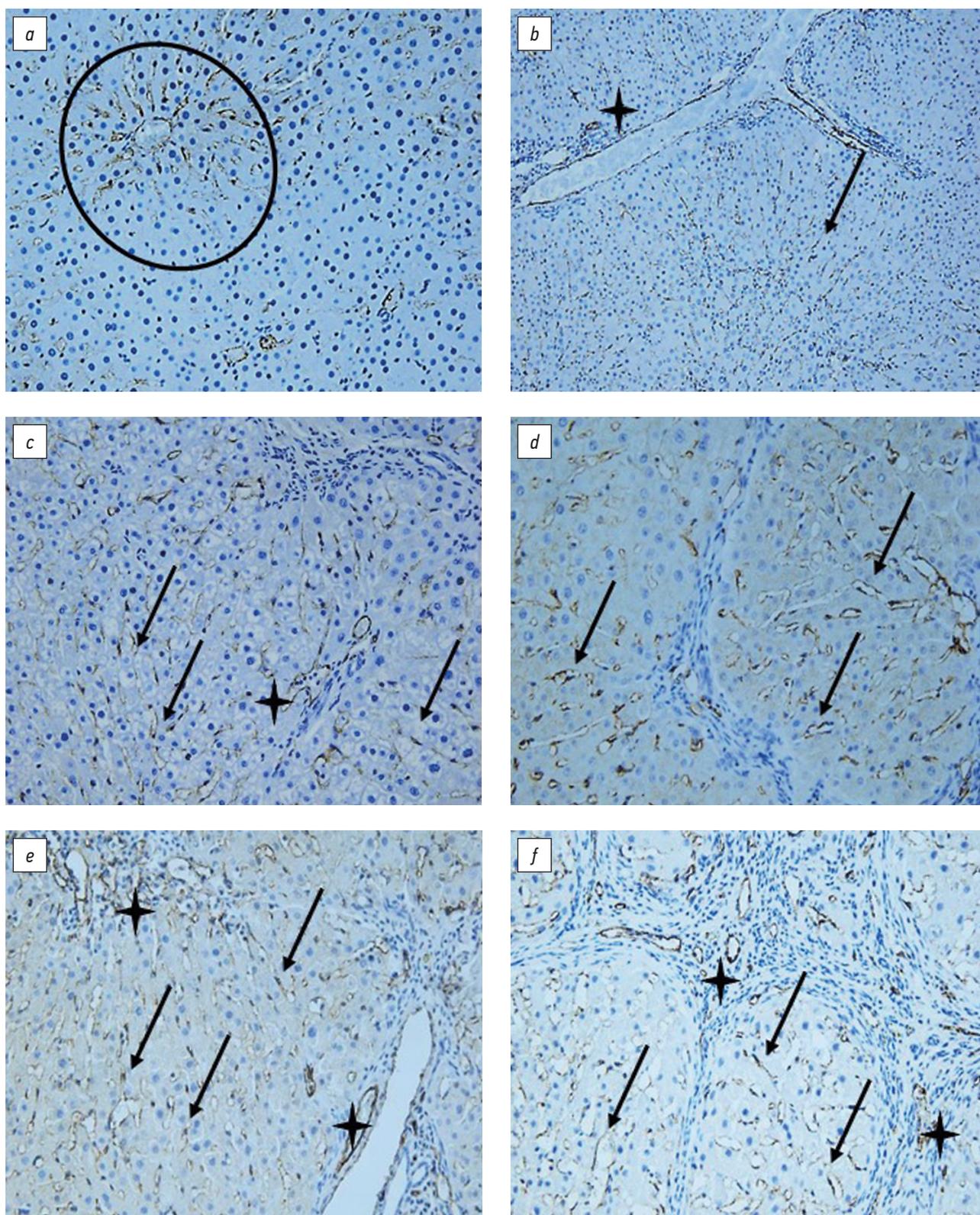


Рис. 3. Микрофотографии гистологических препаратов печени крыс контрольной группы (a), 3 (b), 5 (c), 11 (d), 13 (e), 17 (f) нед после начала эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание на CD31, докраска гематоксилином Майера. Ув.: $\times 400$ (a, c, d, e), $\times 200$ (b, f); a — клетки CD31⁺ в синусоидных капиллярах центральной зоны классической печёночной дольки (овальная рамка); b–f — клетки CD31⁺ в синусоидных капиллярах (стрелки) и в кровеносных сосудах портальных зон и фиброзных септ (звёздочки).

Fig. 3. Histological preparations of rat liver, microphotographs: control group (a), 3 (b), 5 (c), 11 (d), 13 (e), 17 (f) weeks after the start of the experiment. Immunohistochemical staining for CD31, counterstaining with Mayer's hematoxylin. Mag.: $\times 400$ (a, c, d, e), $\times 200$ (b, f); a — CD31⁺ cells in the sinusoidal capillaries of the central zone of the classical hepatic lobule (oval frame); b–f — CD31⁺ cells in the sinusoidal capillaries (arrows) and in the blood vessels of the portal zones and fibrous septa (stars).

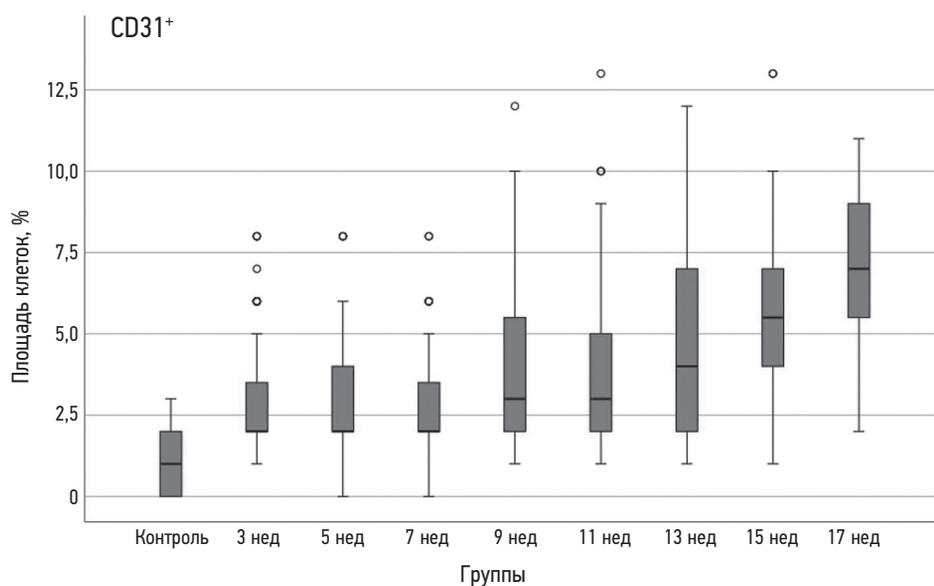


Рис. 4. Изменение площади клеток CD31⁺ на разных этапах исследования.

Fig. 4. Changes in the area of CD31⁺ cells at different stages of the study.

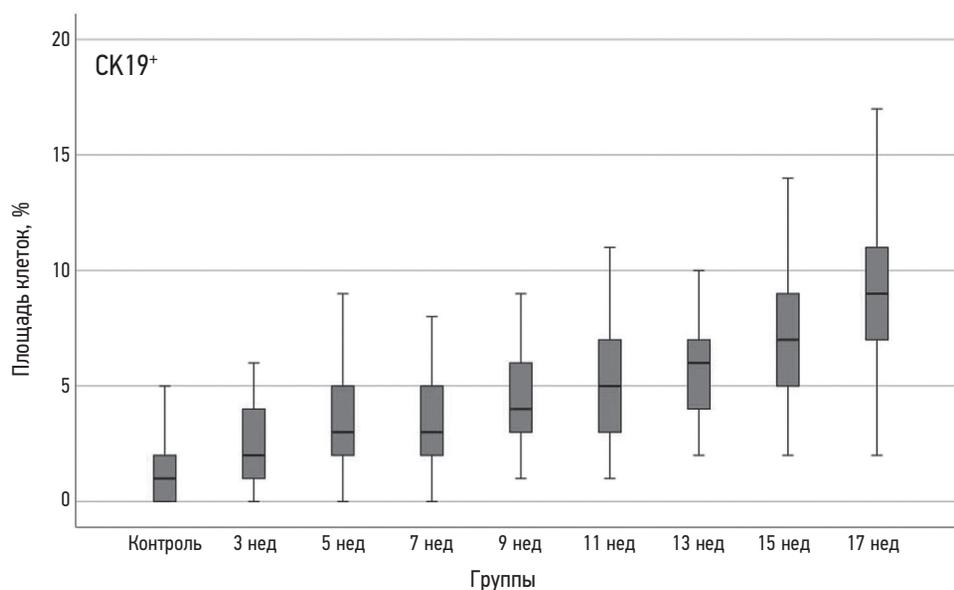


Рис. 5. Изменение площади клеток CK19⁺ на разных этапах исследования.

Fig. 5. Change in the area of CK19⁺ cells at different stages of the study.

и микроРНК-664-3р были уменьшены в 10 раз, а значения микроРНК-489-3р — в 10 000 раз. При этом значения микроРНК-3558-3р увеличены в 100 раз, а микроРНК-3085 — в 1000 раз.

Взаимосвязь патологического ангиогенеза, прогрессирования фиброза и молекулярно-генетических показателей оценивали с помощью анализа корреляций Спирмена. Коэффициенты корреляции были статистически значимы на уровне $p < 0,05$. Результаты анализа представлены на рис. 8.

На основании данных морфологического исследования установлено, что в процессе развития фиброза

с переходом в цирроз наблюдается пропорциональное увеличение количества вен и соединительной ткани на фоне уменьшения количества синусоидов. В связи с этим данные о корреляции исследуемых показателей, представленные на рис. 8, идентичны для количества вен и соединительной ткани, а также имеют обратные величины для количества синусоидов. Не все включённые в исследование микроРНК связаны с прогрессированием фиброза и динамикой количества клеток, несущих маркёры CD31 и CK19. При этом уровень мРНК гена *Ang* в отличие от *Vegfa* также связан с развитием патологического ангиогенеза.

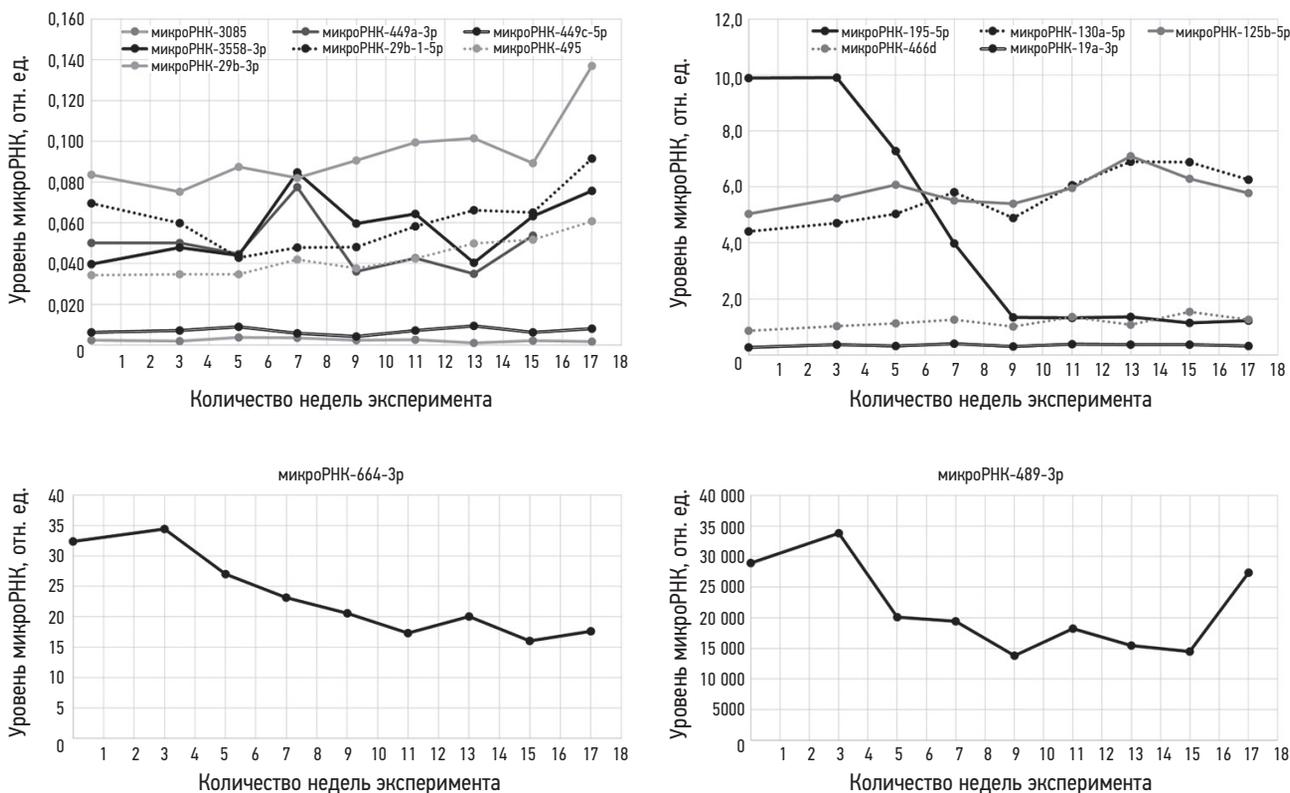


Рис. 6. Динамика относительного уровня микроРНК в процессе фиброгенеза с переходом в цирроз.

Fig. 6. Dynamics of the relative level of microRNAs during fibrogenesis with transition to cirrhosis.

Таблица 4. Различия между уровнем микроРНК в контрольной группе и в экспериментальных группах

Table 4. Differences between microRNAs level in control and experimental groups

Мишень	Статистическая значимость различий значений* между уровнем микроРНК в контрольной точке К (0 нед) и контрольными точками 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 нед эксперимента							
	фиброз			переход	цирроз			
	p (K/3)	p (K/5)	p (K/7)	p (K/9)	p (K/11)	p (K/13)	p (K/15)	p (K/17)
Относительный уровень микроРНК 0,001–0,1								
микроРНК-3085	0,200	0,012	0,231	0,967	0,967	0,136	0,756	0,045
микроРНК-449а-5р	1,000	0,508	0,321	0,098	0,508	0,186	0,563	<0,001
микроРНК-449с-5р	0,098	0,002	0,320	0,186	0,186	0,002	0,563	<0,001
микроРНК-3558-3р	0,003	0,619	<0,001	<0,001	<0,001	0,508	<0,001	<0,001
микроРНК-29b-1-5р	0,136	<0,001	<0,001	<0,001	0,186	0,741	0,283	<0,001
микроРНК-495	0,508	0,507	<0,001	0,406	0,021	<0,001	<0,001	<0,001
микроРНК-29b-3р	0,136	0,246	1,000	0,508	0,020	0,047	0,282	<0,001
Относительный уровень микроРНК 0,1–10,0								
микроРНК-195-5р	0,868	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
микроРНК-130а-5р	0,321	0,098	<0,001	0,098	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
микроРНК-125b-5р	0,160	0,008	0,097	0,407	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
микроРНК-466d	0,186	0,003	<0,001	0,013	<0,001	0,002	<0,001	<0,001
микроРНК-19а-3р	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,005	<0,001	<0,001
Относительный уровень микроРНК 10–100								
микроРНК-664-3р	0,321	0,098	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Относительный уровень микроРНК 10 ⁴								
микроРНК-489-3р	0,068	0,003	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,097

* уровень статистической значимости различий значений с поправкой на множественные сравнения; p=0,003.

* the level of statistical significance of the differences in values with adjustment for multiple comparisons; p=0.003.

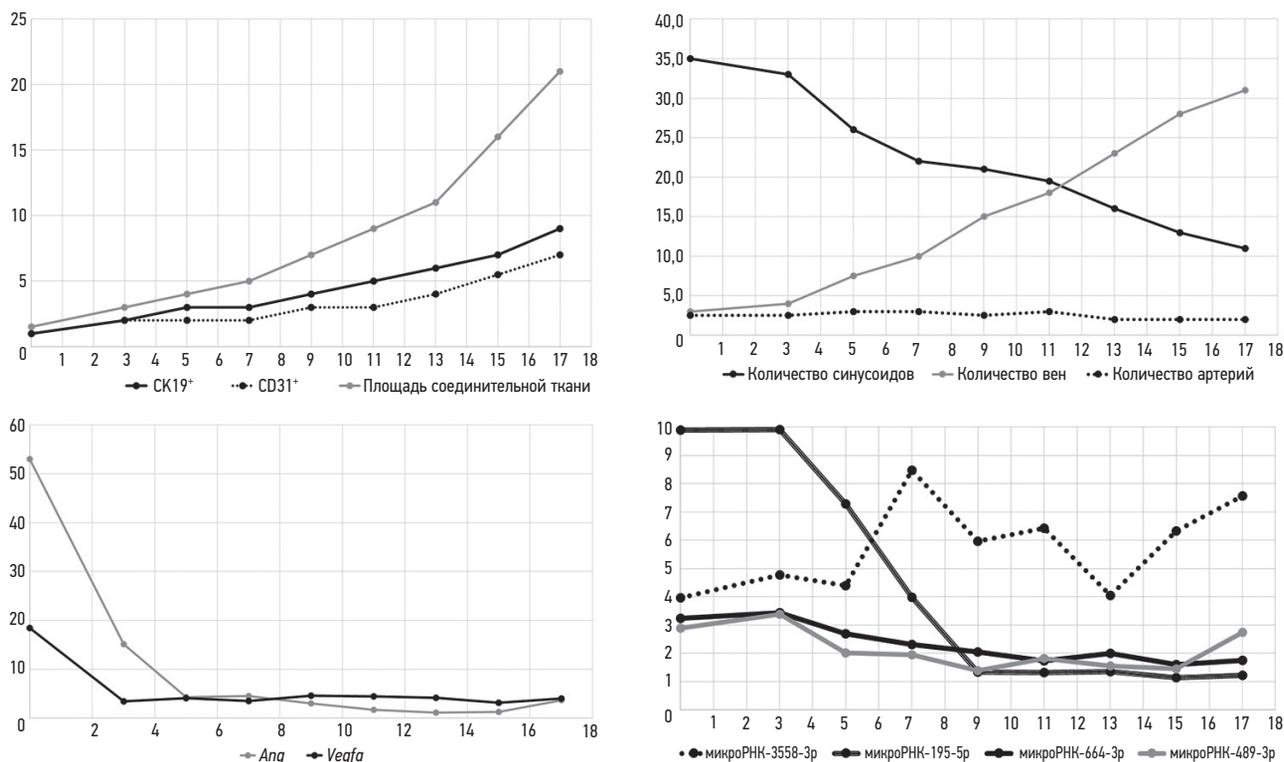


Рис. 7. Изменения морфологических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических показателей, вероятно связанных с процессами инициации и прогрессирования фиброза с переходом в цирроз.

Fig. 7. Changes in morphological, immunohistochemical and molecular genetic parameters, likely associated with the processes of initiation and progression of fibrosis with transition to cirrhosis.

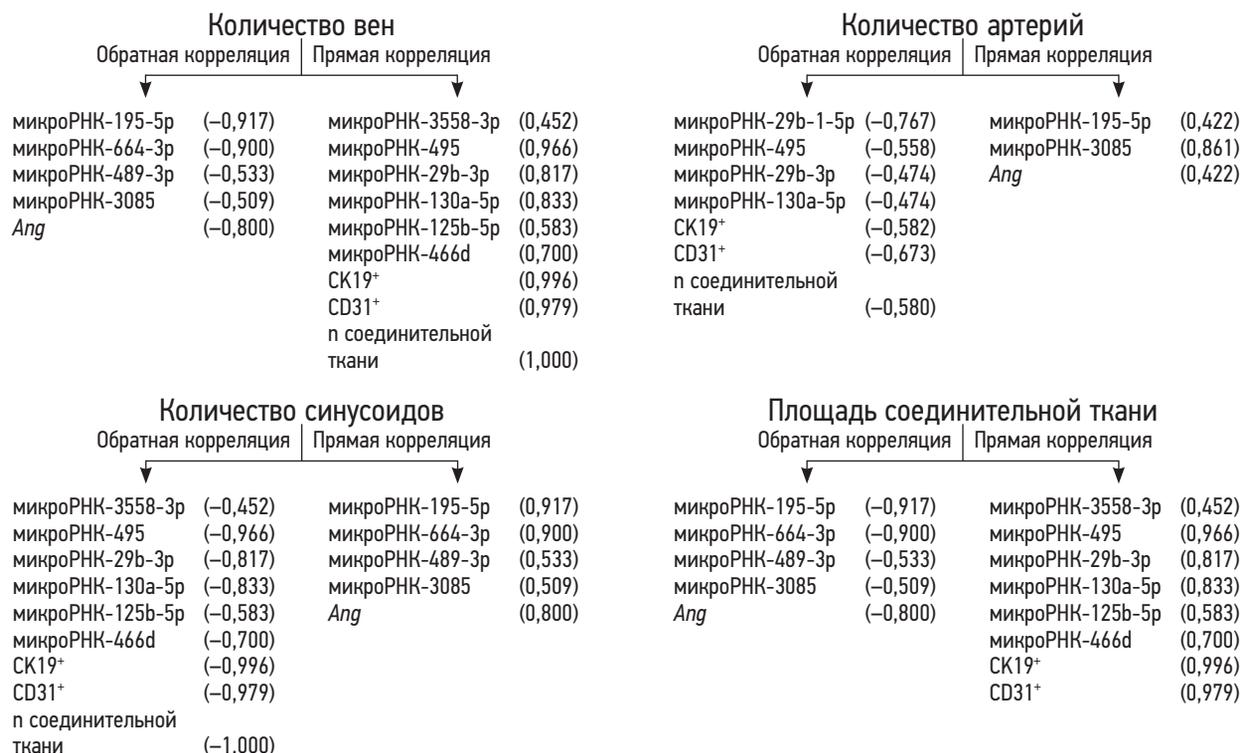


Рис. 8. Корреляционные связи между уровнем микроРНК, количеством междольковых вен, междольковых артерий, синусоидов, площадью соединительной ткани и клетками CD31+, СК19+.

Fig. 8. Correlation between the level of microRNAs, the number of interlobular veins, interlobular arteries, sinusoids, connective tissue area and CD31+, СК19+ cells.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время подтверждена связь микроРНК с фиброзом печени [22, 23]. У. Рап с соавт. показали, что микроРНК-34а может быть потенциальной мишенью при лечении первичного билиарного холангиотита [24]. В другом исследовании отмечено, что микроРНК-497 индуцирует фиброз печени путём активации пути TGF- β /Smad [25]. Согласно исследованиям W. Cuiqiong с соавт. [26], J. Qiu с соавт. [27], микроРНК-101-5р и микроРНК-488-5р ингибируют фиброз печени через координацию сигнального пути TGF- β и снижение синтеза внеклеточного матрикса миофибробластоподобными клетками в эксперименте.

У пациентов с прогрессирующим фиброзом печени установлено падение экспрессии микроРНК-98-5р. При дальнейшем изучении Y. Ma с соавт. определили, что её высокий уровень изменяет передачу молекулярных сигналов пути TGF- β /Smad3 и это приводит к значительному уменьшению активации HSCs [28]. X. Yang с соавт. продемонстрировали рост показателя микроРНК-199а-3р в печени крыс с фиброзом, индуцированным четырёххлористым углеродом, по сравнению с контролем, и у пациентов с циррозом [29]. Гиперэкспрессия микроРНК-29а препятствует передаче сигналов через рецепторы TLR2, TLR4, которые считают одними из ключевых медиаторов фиброза печени [30]. МикроРНК-130а-3р ингибирует активацию и пролиферацию HSCs, способствуя их апоптозу как в сыворотке крови пациентов с циррозом, так и в печени мышей, инфицированных *S. japonicum* [31]. МикроРНК-148а регулируют изменения фенотипа и функций внутрипечёночных макрофагов посредством влияния на передачу молекулярных сигналов KLF6/STAT3 [32]. H. Wang с соавт. выявили, что микроРНК-130b-5р в перспективе может стать терапевтической мишенью при лечении фиброза печени [33].

Несмотря на то, что исследования демонстрируют значимую роль микроРНК в фиброзе печени, использование их в качестве мишеней для ранней диагностики, оценки и прогнозирования фиброгенеза далеко от применения в клинической практике. Вероятно, это связано, во-первых, с тем, что изучение микроРНК проводят преимущественно методом *in vitro*, а полученные результаты *in vivo* подтверждаются не всегда; во-вторых, из-за большого разнообразия клеточной популяции в печени и быстро меняющегося микроокружения (ниши) микроРНК на разных стадиях фиброгенеза могут оказывать различное регуляторное действие на гены и демонстрировать противоположные результаты.

В нашей работе мы выявили статистически значимые корреляционные связи ($p < 0,05$) между показателями площади соединительной ткани и рядом исследуемых микроРНК (см. рис. 8). Эти данные пока не позволяют сделать более конкретные выводы о роли каждой микроРНК-мишени в фиброгенезе.

На сегодняшний день существует небольшое количество публикаций о роли исследуемых нами микроРНК в патологическом ангиогенезе при фиброзе печени. При циррозе и гепатоцеллюлярной карциноме отмечено снижение экспрессии микроРНК-195-5р. Предполагают, что микроРНК-195-5р может оказывать регулирующий эффект на ангиогенез через VEGF и ANG [34].

Проангиогенные факторы VEGF, ANG являются важными звеньями в развитии и прогрессировании хронических заболеваний печени. VEGF — хорошо изученный стимулятор ангиогенеза. Показано, что он способствует развитию патологического ангиогенеза у животных при экспериментальном циррозе печени. Одним из подходов в остановке патологического ангиогенеза является блокада пути VEGF, но клиническое использование этого метода ограничено из-за отсутствия надёжных маркёров и наличия побочных эффектов. В отличие от VEGF проангиогенный фактор ANG менее изучен и преимущественно исследуется в сыворотке крови. ANG экспрессируется эндотелиальными клетками, лимфоцитами, фибробластами и гладкими миоцитами. Известно, что он вызывает изменения цитоскелета клетки путём снижения полимеризации G-актина и модификации F-актина, а также принимает участие в миграции клеток [35–38].

Фиброз печени крыс, индуцированный ТАА, сопровождается патологическим венозным ангиогенезом, уменьшением количества синусоидных капилляров, увеличением количества междольковых вен, ростом площади клеток CD31⁺ и CK19⁺, резким падением уровня мРНК генов *Vegfa* и *Ang* (см. рис. 6). Корреляционный анализ Спирмена выявил статистически значимые корреляционные связи ($p < 0,05$) между уровнями генов мРНК *Ang* и количеством междольковых вен, междольковых артерий, синусоидов, а также площадью соединительной ткани (см. рис. 8). На основании этих данных можно предположить, что ген *Ang* участвует в перестройке внутрипечёночного сосудистого русла и прогрессировании фиброза печени.

Между уровнем мРНК гена *Vegfa* и морфологическими показателями, а также уровнем микроРНК были выявлены статистически значимые корреляционные связи ($p < 0,05$) слабой силы. На стадии мостовидного фиброза и до наступления прогрессирующего цирроза наблюдали рост экспрессии мРНК *Vegfa*, однако контрольного уровня этот ген не достигал. Данный факт наводит на ряд размышлений. Нами не изучался тип патологического венозного ангиогенеза. Тем не менее на основании имеющихся в настоящее время данных литературы и наших собственных результатов можно предположить, что сосуды венозного типа преимущественно формируются по пути инвагинирующего ангиогенеза. Во-первых, такой тип способен быстро изменить структуру сосудистого русла — в течение нескольких часов или даже минут. Во-вторых, по мнению ряда авторов,

ангиогенез протекает с минимальной пролиферативной и миграционной активностью ECs, а также без разрушения базальной мембраны. Более того, он более экономичен с энергетической и метаболической точек зрения [39]. Относительного уровня мРНК гена *Vegfa* может быть достаточно для формирования венозной сосудистой сети по такому типу. К индукторам инвагинирующего ангиогенеза относят VEGFs, эпидермальный фактор роста, сигнальный путь Notch, состояние гипоксии, высокие и низкие показатели напряжения сдвига [1, 7, 10]. Быстрая смена микроокружения в порталных зонах и фиброзных соединительнотканых септах может привести к появлению популяции/популяций клеток, экспрессирующих VEGFA и другие ангиогенные факторы. Эти сосудистые факторы могут стимулировать миграцию синусоидных эндотелиальных клеток в такие области для участия в формировании сосудов. M. Coll с соавт. отмечают, что клетки протоковой реакции, секретировав проангиогенные факторы, способствуют перестройке внутрипечёночного сосудистого русла [40]. Возможно, клетки СК19⁺ протоковой реакции в триадах и грубоволокнистых соединительнотканых септах способны экспрессировать мРНК *Vegfa* и быть участниками патологического венозного ангиогенеза и фиброгенеза.

Сопоставить полученные нами результаты по уровню экспрессии микроРНК, их регуляции мРНК *Vegfa* и *Ang* и связи с перестройкой внутрипечёночного сосудистого русла с подобными результатами в публикациях других авторов на сегодняшний день не представляется возможным, так как в доступной литературе нам не удалось обнаружить аналогов данного эксперимента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлено, что на протяжении всего эксперимента относительный уровень микроРНК варьировал в широком диапазоне значений (10^{-3} – 10^4 отн. ед.) и в большинстве случаев снижался в точке перехода фиброза в цирроз. Рост наблюдали только для микроРНК-29b-3p. Между уровнем микроРНК и количеством междольковых вен, междольковых артерий, синусоидов, а также площадью соединительной ткани установлены статистически значимые корреляционные связи ($p < 0,05$).

Совместный анализ морфологических и молекулярно-генетических показателей позволил предположить, что в рамках настоящей экспериментальной модели фиброза и цирроза печени перестройка внутрипечёночного сосудистого русла и прогрессирование фиброза связаны с изменением уровня мРНК *Ang*. Необходимы

дальнейшие исследования в данном направлении с привлечением других проангиогенных факторов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. 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 её токсическом поражении» (регистрационный номер 20190107).

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

Вклад авторов. Е.И. Лебедева, А.Т. Щастный, А.С. Бабенко — разработка дизайна исследования, обзор литературы, обработка и анализ данных, подготовка материалов и написание текста статьи; Е.И. Лебедева и А.С. Бабенко — эксперимент на животных, морфологическое исследование, метод ПЦР-РВ. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. This study was performed within the framework of State Research Program Fundamental and Applied Sciences for Medicine initiated by the Ministry of Healthcare of the Republic of Belarus; Task 2.89 “Investigating The Role of NOTCH- and TWEAK-Signaling Pathway Gene Expression in Proliferation and Differentiation of Normal and Toxically-Defeated Liver Cells” (Reg. No. 20190107).

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. E.I. Lebedeva, A.T. Shchastniy, A.S. Babenka — study design, literature review, data processing and analysis, preparation of materials and writing the text of the article; E.I. Lebedeva, A.S. Babenka — animal experiment, morphological study, real-time PCR. All authors confirm that their authorship complies with the international ICMJE criteria (all authors made a significant contribution to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version before publication).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dudley A.C., Griffioen A.W. Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies // *Angiogenesis*. 2023. Vol. 26, N 3. P. 313–347. doi: 10.1007/s10456-023-09876-7
2. Wang D., Zhao Y., Zhou Y., et al. Angiogenesis—an emerging role in organ fibrosis // *Int J Mol Sci*. 2023. Vol. 24, N 18. P. 14123. doi: 10.3390/ijms241814123

3. Iwakiri Y., Trebicka J. Portal hypertension in cirrhosis: pathophysiological mechanisms and therapy // *JHEP Rep.* 2021. Vol. 3, N 4. P. 100316. doi: 10.1016/j.jhepr.2021.100316
4. Lin Y., Dong M.Q., Liu Z.M., et al. A strategy of vascular-targeted therapy for liver fibrosis // *Hepatology.* 2022. Vol. 76, N 3. P. 660–675. doi: 10.1002/hep.32299
5. Chen W., Wu P., Yu F., et al. HIF-1 α regulates bone homeostasis and angiogenesis, participating in the occurrence of bone metabolic diseases // *Cells.* 2022. Vol. 11, N 22. P. 3552. doi: 10.3390/cells11223552
6. Della Rocca Y., Fonticoli L., Rajan T.S., et al. Hypoxia: molecular pathophysiological mechanisms in human diseases // *J Physiol Biochem.* 2022. Vol. 78, N 4. P. 739–752. doi: 10.1007/s13105-022-00912-6
7. Ahmad A., Nawaz M.I. Molecular mechanism of VEGF and its role in pathological angiogenesis // *J Cell Biochem.* 2022. Vol. 123, N 12. P. 1938–1965. doi: 10.1002/jcb.30344
8. Wu X., Qian L., Zhao H., et al. CXCL12/CXCR4: an amazing challenge and opportunity in the fight against fibrosis // *Ageing Res Rev.* 2023. Vol. 83. P. 101809. doi: 10.1016/j.arr.2022.101809
9. Cambier S., Gouwy M., Proost P. The chemokines CXCL8 and CXCL12: molecular and functional properties, role in disease and efforts towards pharmacological intervention // *Cell Mol Immunol.* 2023. Vol. 20, N 3. P. 217–251. doi: 10.1038/s41423-023-00974-6
10. Ghalehandi S., Yuzugulen J., Pranjol M.Z.I., Pourgholami M.H. The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF // *Eur J Pharmacol.* 2023. Vol. 949. P. 175586. doi: 10.1016/j.ejphar.2023.175586
11. Gao R., Tang H., Mao J. Programmed cell death in liver fibrosis // *J Inflamm Res.* 2023. Vol. 16. P. 3897–3910. doi: 10.2147/JIR.S427868
12. Park H.J., Choi J., Kim H., et al. Cellular heterogeneity and plasticity during NAFLD progression // *Front Mol Biosci.* 2023. Vol. 10. P. 1221669. doi: 10.3389/fmolb.2023.1221669
13. Pei, Q., Yi Q., Tang L. Liver fibrosis resolution: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities // *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24, N 11. P. Art. 9671. doi: 10.3390/ijms24119671
14. Лебедева Е.И., Щастный А.Т., Бабенко А.С. клеточно-молекулярные механизмы токсического фиброза печени крыс в зависимости от стадий его развития // *Современные технологии в медицине.* 2023. Т. 15, № 4. С. 50–64. EDN: QNUJAC doi: 10.17691/stm2023.15.4.05
15. Lebedeva E.I., Babenka A.S., Hastemir P. FN14 mRNA expression correlates with an increased number of veins during angiogenesis in the process of liver fibrosis // *Int J Mol Cell Med.* 2023. Vol. 11, N 4. P. 274–284. doi: 10.22088/IJMCM.BUMS.11.4.274
16. Kargutkar N., Hariharan P., Nadkarni A. Dynamic interplay of microRNA in diseases and therapeutic // *Clin Genet.* 2023. Vol. 103, N 3. P. 268–276. doi: 10.1111/cge.14256
17. Abdel Halim A.S., Rudayni H.A., Chaudhary A.A., Ali M.A.M. MicroRNAs: small molecules with big impacts in liver injury // *J Cell Physiol.* 2023. Vol. 238, N 1. P. 32–69. doi: 10.1002/jcp.30908
18. Chang Y., Han J.A., Kang S.M., et al. Clinical impact of serum exosomal microRNA in liver fibrosis // *PLoS One.* 2021. Vol. 16, N 9. P. e0255672. doi: 10.1371/journal.pone.0255672
19. Ho P.T.B., Clark I.M., Le L.T.T. MicroRNA-based diagnosis and therapy // *Int J Mol Sci.* 2022. Vol. 23, N 13. P. 7167. doi: 10.3390/ijms23137167
20. Chen Y., Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets // *Nucleic Acids Res.* 2020. Vol. 48, N D1. P. D127–D131. doi: 10.1093/nar/gkz757
21. Androvic P., Valihrach L., Elling J., et al. Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification // *Nucleic Acids Res.* 2017. Vol. 45, N 15. P. e144. doi: 10.1093/nar/gkx588
22. Tadokoro T., Morishita A., Masaki T. Diagnosis and therapeutic management of liver fibrosis by microRNA // *Int J Mol Sci.* 2021. Vol. 22, N 15. P. 8139. doi: 10.3390/ijms22158139
23. Latief U., Tung G.K., Per T.S., et al. Micro RNAs as emerging therapeutic targets in liver diseases // *Curr Protein Pept Sci.* 2022. Vol. 23, N 6. P. 369–383. doi: 10.2174/1389203723666220721122240
24. Pan Y., Wang J., He L., Zhang F. MicroRNA-34a promotes EMT and liver fibrosis in primary biliary cholangitis by regulating TGF- β 1/Smad pathway // *J Immunol Res.* 2021. Vol. 2021. P. 6890423. doi: 10.1155/2021/6890423
25. Zhou Q.Y., Yang H.M., Liu J.X., et al. MicroRNA-497 induced by *Clonorchis sinensis* enhances the TGF- β /Smad signaling pathway to promote hepatic fibrosis by targeting Smad7 // *Parasit Vectors.* 2021. Vol. 14, N 1. P. 472. doi: 10.1186/s13071-021-04972-3
26. Cuiqiong W., Chao X., Xinling F., Yinyan J. Schisan-drin B suppresses liver fibrosis in rats by targeting miR-101-5p through the TGF- β signaling pathway // *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2020. Vol. 48, N 1. P. 473–478. doi: 10.1080/21691401.2020.1717507
27. Qiu J., Wu S., Wang P., et al. miR-488-5p mitigates hepatic stellate cell activation and hepatic fibrosis via suppressing TET3 expression // *Hepatol Int.* 2023. Vol. 17, N 2. P. 463–475. doi: 10.1007/s12072-022-10404-w
28. Ma Y., Yuan X., Han M., et al. miR-98-5p as a novel biomarker suppress liver fibrosis by targeting TGF β receptor 1 // *Hepatol Int.* 2022. Vol. 16, N 3. P. 614–626. doi: 10.1007/s12072-021-10277-5
29. Yang X., Ma L., Wei R., et al. Twist1-induced miR-199a-3p promotes liver fibrosis by suppressing caveolin-2 and activating TGF- β pathway // *Signal Transduct Target Ther.* 2020. Vol. 5, N 1. P. 75. doi: 10.1038/s41392-020-0169-z
30. Lin Y.C., Wang F.S., Yang Y.L., et al. MicroRNA-29a mitigation of toll-like receptor 2 and 4 signaling and alleviation of obstructive jaundice-induced fibrosis in mice // *Biochem Biophys Res Commun.* 2018. Vol. 496, N 3. P. 880–886. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.132
31. Liu L., Wang P., Wang Y.S., et al. MiR-130a-3p alleviates liver fibrosis by suppressing HSCs activation and skewing macrophage to Ly6C⁺ Phenotype // *Front Immunol.* 2022. Vol. 12. P. 696069. doi: 10.3389/fimmu.2021.696069
32. Tian S., Zhou X., Zhang M., et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes protect against liver fibrosis via delivering miR-148a to target KLF6/STAT3 pathway in macrophages // *Stem Cell Res Ther.* 2022. Vol. 13, N 1. P. 330. doi: 10.1186/s13287-022-03010-y
33. Wang H., Wang Z., Wang Y., et al. miRNA-130b-5p promotes hepatic stellate cell activation and the development of liver fibrosis by suppressing SIRT4 expression // *J Cell Mol Med.* 2021. Vol. 25, N 15. P. 7381–7394. doi: 10.1111/jcmm.16766
34. Liu Y., Wu X., Gao Y., et al. Aptamer-functionalized peptide H3CR5C as a novel nanovehicle for codelivery of fasudil and miRNA-195 targeting hepatocellular carcinoma // *Int J Nanomedicine.* 2016. Vol. 11. P. 3891–3905. doi: 10.2147/IJN.S108128
35. Li H. Angiogenesis in the progression from liver fibrosis to cirrhosis and hepatocellular carcinoma // *Expert*

Rev Gastroenterol Hepatol. 2021. Vol. 15, N 3. P. 217–233. doi: 10.1080/17474124.2021.1842732

36. Elpek G.Ö. Angiogenesis and liver fibrosis // *World J Hepatol*. 2015. Vol. 7, N 3. P. 377–391. doi: 10.4254/wjh.v7.i3.377

37. Ding Q., Tian X.G., Li Y., et al. Carvedilol may attenuate liver cirrhosis by inhibiting angiogenesis through the VEGF-Src-ERK signaling pathway // *World J Gastroenterol*. 2015. Vol. 21, N 32. P. 9566–9576. doi: 10.3748/wjg.v21.i32.9566

38. Osawa Y., Yoshio S., Aoki Y., et al. Blood angiopoietin-2 predicts liver angiogenesis and fibrosis in hepatitis

C patients // *BMC Gastroenterol*. 2021. Vol. 21, N 1. P. 55. doi: 10.1186/s12876-021-01633-8

39. Nitzsche B., Rong W.W., Goede A., et al. Coalescent angiogenesis-evidence for a novel concept of vascular network maturation // *Angiogenesis*. 2022. Vol. 25, N 1. P. 35–45. doi: 10.1007/s10456-021-09824-3

40. Coll M., Ariño S., Martínez-Sánchez C., et al. Ductular reaction promotes intrahepatic angiogenesis through Slit2-Roundabout 1 signaling // *Hepatology*. 2022. Vol. 75, N 2. P. 353–368. doi: 10.1002/hep.32140

REFERENCES

- Dudley AC, Griffioen AW. Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies. *Angiogenesis*. 2023;26(3):313–347. doi: 10.1007/s10456-023-09876-7
- Wang D, Zhao Y, Zhou Y, et al. Angiogenesis-an emerging role in organ fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2023;24(18):14123. doi: 10.3390/ijms241814123
- Iwakiri Y, Trebicka J. Portal hypertension in cirrhosis: pathophysiological mechanisms and therapy. *JHEP Rep*. 2021;3(4):100316. doi: 10.1016/j.jhepr.2021.100316
- Lin Y, Dong MQ, Liu ZM, et al. A strategy of vascular-targeted therapy for liver fibrosis. *J. Hepatology*. 2022;76(3):660–675. doi: 10.1002/hep.32299
- Chen W, Wu P, Yu F, et al. HIF-1 α regulates bone homeostasis and angiogenesis, participating in the occurrence of bone metabolic diseases. *Cells*. 2022;11(22):3552. doi: 10.3390/cells11223552
- Della Rocca Y, Fonticoli L, Rajan TS, et al. Hypoxia: molecular pathophysiological mechanisms in human diseases. *J Physiol Biochem*. 2022;78(4):739–752. doi: 10.1007/s13105-022-00912-6
- Ahmad A, Nawaz MI. Molecular mechanism of VEGF and its role in pathological angiogenesis. *J Cell Biochem*. 2022;123(12):1938–1965. doi: 10.1002/jcb.30344
- Wu X, Qian L, Zhao H, et al. CXCL12/CXCR4: an amazing challenge and opportunity in the fight against fibrosis. *Ageing Res Rev*. 2023;83:101809. doi: 10.1016/j.arr.2022.101809
- Cambier S, Gouwy M, Proost P. The chemokines CXCL8 and CXCL12: molecular and functional properties, role in disease and efforts towards pharmacological intervention. *Cell Mol Immunol*. 2023;20(3):217–251. doi: 10.1038/s41423-023-00974-6
- Ghalehbandi S, Yuzugulen J, Pranjol MZI, Pourgholami MH. The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF. *Eur J Pharmacol*. 2023;949:175586. doi: 10.1016/j.ejphar.2023.175586
- Gao R., Tang H., Mao J. Programmed cell death in liver fibrosis. *J Inflamm Res*. 2023;16:3897–3910. doi: 10.2147/JIR.S427868
- Park HJ, Choi J, Kim H, et al. Cellular heterogeneity and plasticity during NAFLD progression. *Front Mol Biosci*. 2023;10:1221669. doi: 10.3389/fmolb.2023.1221669
- Pei Q, Yi Q, Tang L. Liver fibrosis resolution: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Int J Mol Sci*. 2023;24(11):9671. doi: 10.3390/ijms24119671
- Lebedeva EI, Shchastniy AT, Babenka AS. 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. EDN: QNUJAC doi: 10.17691/stm2023.15.4.05
- Lebedeva EI, Babenka AS, Hastemir P, et al. FN14 mRNA expression correlates with an increased number of veins during angiogenesis in the process of liver fibrosis. *Int J Mol Cell Med*. 2022;11(4):274–284. doi: 10.22088/IJMCM.BUMS.11.4.274
- Kargutkar N, Hariharan P, Nadkarni A. Dynamic interplay of microRNA in diseases and therapeutic. *Clin Genet*. 2023;103(3):268–276. doi: 10.1111/cge.14256
- Abdel Halim AS, Rudayni HA, Chaudhary AA, Ali MAM. MicroRNAs: small molecules with big impacts in liver injury. *J Cell Physiol*. 2023;238(1):32–69. doi: 10.1002/jcp.30908
- Chang Y, Han JA, Kang SM, et al. Clinical impact of serum exosomal microRNA in liver fibrosis. *PLoS One*. 2021;16(9):e0255672. doi: 10.1371/journal.pone.0255672
- Ho PTB, Clark IM, Le LTT. MicroRNA-based diagnosis and therapy. *Int J Mol Sci*. 2022;23(13):7167. doi: 10.3390/ijms23137167
- Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D127–D131. doi: 10.1093/nar/gkz757
- Androvic P, Valihrach L, Elling J, et al. Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(15):e144. doi: 10.1093/nar/gkx588
- Tadokoro T, Morishita A, Masaki T. Diagnosis and therapeutic management of liver fibrosis by microRNA. *Int J Mol Sci*. 2021;22(15):8139. doi: 10.3390/ijms22158139
- Latief U, Tung GK, Per TS, et al. Micro RNAs as emerging therapeutic targets in liver diseases. *Curr Protein Pept Sci*. 2022;23(6):369–383. doi: 10.2174/1389203723666220721122240
- Pan Y, Wang J, He L, Zhang F. MicroRNA-34a promotes EMT and liver fibrosis in primary biliary cholangitis by regulating TGF- β 1/Smad pathway. *J Immunol Res*. 2021;2021:6890423. doi: 10.1155/2021/6890423
- Zhou QY, Yang HM, Liu JX, et al. MicroRNA-497 induced by *Clonorchis sinensis* enhances the TGF- β /Smad signaling pathway to promote hepatic fibrosis by targeting Smad7. *Parasit Vectors*. 2021;14(1):472. doi: 10.1186/s13071-021-04972-3
- Cuiqiong W, Chao X, Xinling F, Yinyan J, Schisandrin B suppresses liver fibrosis in rats by targeting miR-101-5p through the TGF- β signaling pathway. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2020;48(1):473–478. doi: 10.1080/21691401.2020.1717507
- Qiu J, Wu S, Wang P, et al. miR-488-5p mitigates hepatic stellate cell activation and hepatic fibrosis via suppressing TET3 expression. *Hepatol Int*. 2023;17(2):463–475. doi: 10.1007/s12072-022-10404-w
- Ma Y, Yuan X, Han M, et al. miR-98-5p as a novel biomarker suppress liver fibrosis by targeting TGF β receptor 1. *Hepatol Int*. 2022;16(3):614–626. doi: 10.1007/s12072-021-10277-5
- Yang X, Ma L, Wei R, et al. Twist1-induced miR-199a-3p promotes liver fibrosis by suppressing caveolin-2 and activat-

ing TGF- β pathway. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):75. doi: 10.1038/s41392-020-0169-z

30. Lin YC, Wang FS, Yang YL, et al. MicroRNA-29a mitigation of toll-like receptor 2 and 4 signaling and alleviation of obstructive jaundice-induced fibrosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;496(3):880–886. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.132

31. Liu L, Wang P, Wang YS, et al. MiR-130a-3p alleviates liver fibrosis by suppressing HSCs activation and skewing macrophage to Ly6C⁺ phenotype. *Front Immunol.* 2021;12:696069. doi: 10.3389/fimmu.2021.696069

32. Tian S, Zhou X, Zhang M, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes protect against liver fibrosis via delivering miR-148a to target KLF6/STAT3 pathway in macrophages. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1):330. doi: 10.1186/s13287-022-03010-y

33. Wang H, Wang Z, Wang Y, et al. miRNA-130b-5p promotes hepatic stellate cell activation and the development of liver fibrosis by suppressing SIRT4 expression. *J Cell Mol Med.* 2021;25(15):7381–7394. doi: 10.1111/jcmm.16766

34. Liu Y, Wu X, Gao Y, et al. Aptamer-functionalized peptide H3CR5C as a novel nanovehicle for codelivery of fasudil and

miRNA-195 targeting hepatocellular carcinoma. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:3891–3905. doi: 10.2147/IJN.S108128

35. Li H. Angiogenesis in the progression from liver fibrosis to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021;15(3):217–233. doi: 10.1080/17474124.2021.1842732

36. Elpek GÖ. Angiogenesis and liver fibrosis. *World J Hepatol.* 2015;7(3):377–391. doi: 10.4254/wjh.v7.i3.377

37. Ding Q, Tian XG, Li Y, et al. Carvedilol may attenuate liver cirrhosis by inhibiting angiogenesis through the VEGF-Src-ERK signaling pathway. *World J Gastroenterol.* 2015;21(32):9566–9576. doi: 10.3748/wjg.v21.i32.9566

38. Osawa Y, Yoshio S, Aoki Y, et al. Blood angiopoietin-2 predicts liver angiogenesis and fibrosis in hepatitis C patients. *BMC Gastroenterol.* 2021;21(1):55. doi: 10.1186/s12876-021-01633-8

39. Nitzsche B, Rong WW, Goede A, et al. Coalescent angiogenesis-evidence for a novel concept of vascular network maturation. *Angiogenesis.* 2022;25(1):35–45. doi: 10.1007/s10456-021-09824-3

40. Coll M, Ariño S, Martínez-Sánchez C, et al. Ductular reaction promotes intrahepatic angiogenesis through Slit2-Roundabout 1 signaling. *Hepatology.* 2022;75(2):353–368. doi: 10.1002/hep.32140

ОБ АВТОРАХ

* **Лебедева Елена Ивановна**, канд. биол. наук, доцент;
адрес: Республика Беларусь, 210009, Витебск, пр-т Фрунзе, д. 27;
ORCID: 0000-0003-1309-4248;
eLibrary SPIN: 4049-3213;
e-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru

Бабенко Андрей Сергеевич, канд. хим. наук,
доцент;
ORCID: 0000-0002-5513-970X;
eLibrary SPIN: 9715-4070;
e-mail: labmdbt@gmail.com

Щастный Анатолий Тадеушевич, д-р мед. наук, профессор;
ORCID: 0000-0003-2796-4240;
eLibrary SPIN: 3289-6156;
e-mail: rectorvsmu@gmail.com

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

AUTHORS' INFO

* **Elena I. Lebedeva**, PhD, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor;
address: 27 Frunze avenue, 210009 Vitebsk, Republic of Belarus;
ORCID: 0000-0003-1309-4248;
eLibrary SPIN: 4049-3213;
e-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru

Andrei S. Babenka, PhD, Cand. Sci. (Chemistry),
Associate Professor;
ORCID: 0000-0002-5513-970X;
eLibrary SPIN: 9715-4070;
e-mail: labmdbt@gmail.com

Anatoly T. Shchastniy, Dr. Sci. (Medicine), Professor;
ORCID: 0000-0003-2796-4240;
eLibrary SPIN: 3289-6156;
e-mail: rectorvsmu@gmail.com