

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.632588>

Математическая модель формирования цирроза печени при проведении морфологических и молекулярно-генетических доклинических исследований

Е.И. Лебедева¹, А.Т. Щастный¹, А.С. Бабенко², В.Н. Мартинков³, Д.А. Зиновкин⁴,
Э.А. Надыров⁴

¹ Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Витебск, Республика Беларусь;

² Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь;

³ Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, Гомель, Республика Беларусь;

⁴ Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Республика Беларусь

АННОТАЦИЯ

Обоснование. На текущий момент исследователи описывают существующие проблемы при разработке новых методов лечения фиброза и цирроза печени: плохое качество экспериментальных моделей, недостаточную продолжительность испытаний и отсутствие маркёров терапевтического ответа. Отдельной задачей является стандартизация процесса формирования цирроза печени при доклинических испытаниях, что необходимо для получения за короткий срок точных количественных оценок.

Цель исследования — разработка математической модели формирования цирроза печени при доклинических испытаниях.

Материалы и методы. Фиброз и цирроз печени у крыс-самцов линии Wistar индуцировали свежеприготовленным раствором тиацетамида в течение 17 нед. Определяли площадь волокнистой соединительной ткани в процентах к площади изображения. Измеряли площадь междольковых вен в мкм². Подсчитывали количества клеток, экспрессирующих маркёр FAP и маркер α -SMA. Уровень экспрессии мРНК генов *Vegfa* и *Yap1* оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Построение математической модели для классификации наблюдений по стадиям осуществляли, используя множественную логистическую регрессию с пошаговым отбором предикторов, с последующим расчётом чувствительности, специфичности и площади под кривой (AUC) с 95% доверительным интервалом на основе ROC-анализа.

Результаты. Разработана математическая модель формирования цирроза печени. Модель основана на значениях двух показателей: клетки FAP⁺ и мРНК *Yap1* — и характеризуется хорошим морфологическим и молекулярно-генетическим качеством. Полученное значение площади под ROC-кривой 0,883 позволяет говорить о хороших результатах классификации случаев.

Заключение. Математическая модель даёт возможность дифференцировать стадию цирроза печени от стадии фиброза при проведении доклинических исследований, что послужит основой для изучения патогенеза фиброза и цирроза печени; определения новых потенциальных молекулярных мишеней для антифибротической терапии; снижения числа дорогостоящих, трудоёмких лабораторных исследований.

Ключевые слова: экспериментальный фиброз и цирроз печени; математическая модель; гистологические и молекулярно-генетические исследования.

Как цитировать:

Лебедева Е.И., Щастный А.Т., Бабенко А.С., Мартинков В.Н., Зиновкин Д.А., Надыров Э.А. Математическая модель формирования цирроза печени при проведении морфологических и молекулярно-генетических доклинических исследований // Морфология. 2024. Т. 162, № 2. С. 140–153.
DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.632588>

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.632588>

Mathematical model of liver cirrhosis formation during morphological and molecular-genetic preclinical studies

Elena I. Lebedeva¹, Anatoliy T. Shchastniy¹, Andrei S. Babenka², Victor N. Martinkov³, Dmitry A. Zinovkin⁴, Eldar A. Nadyrov⁴

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

² Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;

³ Republican Research Centre for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Republic of Belarus;

⁴ Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

ABSTRACT

BACKGROUND: Currently, researchers describe challenges in developing new treatments for fibrosis and cirrhosis: poor quality of preclinical models, insufficient trial duration, and lack of markers of therapeutic response. A separate task is to standardize the process of liver cirrhosis formation in preclinical trials, which is necessary to obtain accurate quantitative estimates in a short timeframe.

AIM: This study aimed to develop a mathematical model for the formation of liver cirrhosis during preclinical trials.

MATERIALS AND METHODS: Liver fibrosis and cirrhosis were induced in male Wistar rats using freshly prepared thioacetamide solution for 17 weeks. The area of connective tissue was determined as a percentage of the image area. The area of interlobular veins was measured in μm^2 . The numbers of cells expressing the FAP marker and the α -SMA marker were counted. The level of mRNA expression of the *Vegfa* and *Yap1* genes was assessed by real-time polymerase chain reaction. A mathematical model for classifying observations into stages was constructed using multiple logistic regression with stepwise selection of predictors, followed by calculation of sensitivity, specificity, and area under the curve with a 95% confidence interval based on ROC analysis.

RESULTS: As a result of the analysis, a mathematical model of liver cirrhosis formation was developed. The model is based on the values of two indicators: FAP⁺ cells and *Yap1* mRNA and demonstrated good quality. The resulting value of the area under the ROC curve of 0.883 suggests good results for classifying cases.

CONCLUSIONS: The mathematical model makes it possible to differentiate the stage of liver cirrhosis from the stage of fibrosis during preclinical studies. It provides a foundation for studying the pathogenesis of liver fibrosis and cirrhosis, identifying new potential molecular targets for antifibrotic therapy, and reducing the number of expensive, labor-intensive laboratory tests.

Keywords: experimental fibrosis and cirrhosis of the liver; mathematical model; histological and molecular genetic studies.

To cite this article:

Lebedeva EI, Shchastniy AT, Babenka AS, Martinkov VN, Zinovkin DA, Nadyrov EA. Mathematical model of liver cirrhosis formation during morphological and molecular-genetic preclinical studies. *Morphology*. 2024;162(2):140–153. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.632588>

DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.632588>

临床前形态学和分子遗传学研究中肝硬化形成的数学模型

Elena I. Lebedeva¹, Anatoliy T. Shchastniy¹, Andrei S. Babenka², Victor N. Martinkov³, Dmitry A. Zinovkin⁴, Eldar A. Nadyrov⁴

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

² Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;

³ Republican Research Centre for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Republic of Belarus;

⁴ Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

摘要

论证。目前，研究人员描述了纤维化和肝硬化新疗法开发过程中存在的问题：实验模型质量差、试验时间不足以及缺乏治疗反应标志物。另一个挑战是临床前试验中肝硬化形成过程的标准化，这对于在短时间内获得准确的定量估计是必要的。

这项工作的目的是在临床前试验中建立肝硬化形成的数学模型。

材料和方法。用新鲜制备的硫代乙酰胺溶液诱导雄性 Wistar 大鼠肝纤维化和肝硬化 17 周。测定纤维结缔组织面积占图像面积的百分比。间隔静脉的面积以 μm^2 为单位。计数表达 FAP 标记和 α -SMA 标记的细胞数量。通过实时聚合酶链反应评估 *Vegfa* 和 *Yap1* 基因的 mRNA 表达水平。通过逐步选择预测因子的多元逻辑回归，构建了一个数学模型，将观察结果分为不同阶段，然后根据 ROC 分析计算灵敏度、特异性和曲线下面积（AUC）以及 95% 的置信区间。

结果。我们建立了一个肝硬化形成的数学模型。该模型基于两个指标值（FAP+ 细胞和 *Yap1* mRNA），具有良好的形态学和分子遗传学质量。ROC 曲线下的面积值为 0.883，表明病例分类结果良好。

结论。该数学模型使得在临床前研究中区分肝硬化阶段和肝纤维化阶段成为可能。这将成为研究肝纤维化和肝硬化发病机制、确定抗纤维化治疗新的潜在分子靶点以及减少昂贵、耗时的实验室检测次数的基础。

关键词：实验性肝纤维化和肝硬化；数学模型；组织学和分子遗传学研究。

To cite this article:

Lebedeva EI, Shchastniy AT, Babenka AS, Martinkov VN, Zinovkin DA, Nadyrov EA. 临床前形态学和分子遗传学研究中肝硬化形成的数学模型. *Morphology*. 2024;162(2):140–153. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.632588>

ОБОСНОВАНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения, в год от хронических заболеваний печени различной этиологии умирают более 2 млн жителей планеты, в том числе около 1,32 млн — от цирроза печени. За последние десятилетия наметилась тенденция к росту заболеваемости и смертности от цирроза печени. При этом задача создания эффективных антифибротических лекарственных средств до сих пор не решена [1–4].

Большинство исследователей описывают существующие проблемы при разработке новых методов лечения фиброза и цирроза: плохое качество экспериментальных моделей, недостаточную продолжительность испытаний и отсутствие маркёров терапевтического ответа. Не менее важным представляется вопрос поиска клеточных и молекулярно-генетических маркёров стадии перехода фиброза в цирроз, что необходимо для создания и анализа новых методов медикаментозной коррекции фиброза и цирроза печени [5–10].

В ранее проведённых исследованиях с использованием девяти временных точек нами были представлены результаты оценки патогистологических изменений в процессе постепенной прогрессии фиброза печени, что позволило рассмотреть фиброз и цирроз в соответствии с их стадиями. Мы обратили внимание на то, что период с 9-й по 13-ю неделю имеет исключительные морфологические особенности (темпы разрастания фиброзной ткани, смена фенотипического состава и количества/площади клеток, изменение уровня экспрессии мРНК генов) по сравнению с другими сроками эксперимента. На основании полученных результатов установили стадию перехода фиброза в цирроз как самостоятельный отдельный этап фиброгенеза [11].

Отдельной проблемой является стандартизация процесса формирования цирроза печени при доклинических испытаниях, что необходимо для получения за короткий срок точных количественных оценок и уменьшения объёма дорогостоящих и трудоёмких лабораторных исследований.

Цель работы — разработка математической модели формирования цирроза печени при доклинических испытаниях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная модель

Дизайн работы 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 г.). Исследование проводили в соответствии с этическими принципами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых

для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006).

Фиброз и цирроз печени у крыс-самцов линии Wistar индуцировали свежеприготовленным раствором тиаоацетамида, который вводили интрагастрально через зонд в дозе 200 мг/кг массы тела 2 раза в неделю в течение 17 нед. Подробнее создание экспериментальной модели токсического фиброза и цирроза, индуцированного тиаоацетамидом, описано в соответствующих методических рекомендациях [12]. Крысы контрольной группы получали воду без тиаоацетамида в аналогичном объёме.

Животных разделили на 8 групп ($n=12$ в каждой): 3 нед (1-я группа, стадия портального фиброза F1A/F1B), 5 нед (2-я группа, прогрессирующий фиброз F2A/F2B–F3A), 7 нед (3-я группа, прогрессирующий фиброз F2B–F3A/F3B), 9 нед (4-я группа, стадия узловой перестройки паренхимы F3B/F4), 11 нед (5-я группа, стадия узловой перестройки паренхимы F5A/F5B), 13 нед (6-я группа, неполный цирроз F5B/F6), 15 нед (7-я группа, полный цирроз F6), 17 нед (8-я группа, полный цирроз F6). Крыс выводили из эксперимента согласно разделению на группы декапитацией под кратковременным эфирным наркозом.

Гистологическое, иммуногистохимическое и морфометрическое исследования

Для выявления волокнистого компонента соединительной ткани срезы печени окрашивали по Маллори. Стадии фиброза определяли по разработанной ранее модифицированной полуколичественной шкале фиброза печени для оценки прогрессирования и регресса токсического фиброза печени в доклинических исследованиях [13]. Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах. В качестве маркёра активированных портальных фибробластов применяли поликлональные кроличьи антитела FAP (белок активации фибробластов, fibroblast activation protein) — каталожный номер E-AB-32870, разведение 1:100; маркёра активированных звёздчатых клеток — моноклональные мышиные антитела α -SMA (альфа-актин гладкой мускулатуры, alpha smooth muscle actin) — каталожный номер E-AB-22155, разведение 1:1000. Белок FAP был выбран в качестве маркёра, так как, по данным современной литературы, формирование волокнистой соединительной ткани обусловлено гетерогенной популяцией миофибробластов. Предполагают, что портальные фибробласты являются второй популяцией клеток, вырабатывающих межклеточное вещество при фиброзе печени. FAP экспрессируется только на активированных портальных фибробластах, которые практически не пересекаются с фибробластами, экспрессирующими α -SMA. На сегодняшний день портальные фибробласты остаются малоизученными в отличие от достаточно хорошо описанных звёздчатых клеток [14–16].

С целью объективной интерпретации результатов для каждой исследуемой серии (группы животных) использовали положительный и отрицательный контроль.

Гистологические препараты исследовали с использованием компьютерных программ ImageScope Color и cellSens Standard. Определяли площадь волокнистой соединительной ткани в процентах к площади изображения. Измеряли площадь междольковых вен в мкм^2 . Подсчитывали количества клеток, экспрессирующих маркер FAP (клетки FAP⁺) и маркер α -SMA (клетки α -SMA⁺). Все измерения (мкм^2) осуществляли путём микрофотосъёмки 10 случайных неперекрывающихся полей зрения препаратов печени цифровой камерой OLYMPUS XC30 (Olympus, Япония) на базе микроскопа OLYMPUS BX51 (Olympus, Япония) при $\times 200$, $\times 400$.

Определение уровня мРНК *Vegfa*, *Yap1*

В качестве молекулярных мишеней для исследования были выбраны два гена: *Vegfa* (фактор роста эндотелия сосудов A) и *Yap1* (Yes-связанный белок типа 1), продукты которых, согласно данным литературы, вовлекаются в процессы инициации и прогрессирования фиброза. Семейство фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factors, VEGFs) является индукторами ангиогенеза. Ключевую роль в прогрессировании фиброза печени отводят патологическому ангиогенезу и капилляризации синусоидов, предполагая, что эти сопутствующие морфологические процессы определяют его патогенез и исход заболевания [17, 18]. Показано, что при фиброзе печени белок YAP играет важную роль в активации звёздчатых клеток и его рассматривают в качестве потенциального маркера. На текущий момент сведения о функции YAP в прогрессировании фиброза печени малы [19, 20].

Уровень экспрессии мРНК генов *Vegfa* (референсная последовательность мРНК — NM_031836.3), *Yap1* (референсная последовательность мРНК — NM_001034002.2) определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием флуоресцентно-меченых зондов. Для выделения РНК применяли набор АртРНК MiniSpin, для проведения обратной транскрипции — набор реагентов ArtMMLV Total («АртБиоТех», Беларусь); ПЦР-РВ выполняли с применением специфических олигонуклеотидных праймеров, зондов и реагентов производства компании «Праймтех» (Беларусь). Методика ПЦР-РВ подробно описана в статье [11].

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета MedCalc 20 (MedCalc Software Ltd, Бельгия). Соответствие распределения данных нормальному распределению анализировали с помощью критерия Шапиро–Уилка, равенство дисперсий показателей в сопоставляемых группах — с использованием критерия Левена. Для описания показателей использовали значения медианы (Me), 25-го и 75-го перцентилей (Me [25%; 75%]). Наличие взаимосвязи между изучаемыми показателями определяли на основе коэффициента

ранговой корреляции Спирмена (r). Для анализа различий по значениям показателей на разных этапах эксперимента использовали критерий Вилкоксона для связанных групп. Построение математической модели для классификации качественной бинарной переменной осуществляли с помощью множественной логистической регрессии с пошаговым отбором предикторов, с последующим расчётом площади под кривой (AUC) с 95% доверительным интервалом (95% ДИ), чувствительности и специфичности на основе ROC-анализа. В качестве критического уровня статистической значимости использовали значение $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Рассмотрим характеристики показателей, используемых в качестве предикторов для определения стадии цирроза.

Патогистологические изменения печени крыс на разных стадиях фиброза и цирроза. По прошествии 3 нед эксперимента в печени крыс выявили умеренные фиброзные расширения части портальных зон (портальный фиброз) с неполными порто-портальными тонкими соединительнотканнми септами (стадия F1A/F1B). Через 5 и 7 нед установили мостовидный фиброз, и его стадия была равной F2A/F2B–F3A и F2B–F3A/F3B соответственно (рис. 1, а). Местами в гистологических препаратах наблюдали перисинусоидный, центрлобулярный и диффузный перичеселлюлярный фиброз печени (рис. 1, б). По завершении 9-й недели вблизи отдельных портальных триад происходила узловая трансформация паренхимы с образованием единичных ложных печёночных долек (начальная стадия портального цирроза печени, стадия фиброза F3B/F4, рис. 1, с). Впоследствии при нарастании интоксикации крыс (11 и 13 нед) определили узловую перестройку паренхимы, которая характеризовалась нарушением балочного строения и образованием ложных печёночных долек разного диаметра и формы (стадии F5A/F5B и F5B–F6, рис. 1, д). На следующих этапах эксперимента (15 и 17 нед, рис. 1, е) в печени отмечался крупноочаговый некроз гепатоцитов, в отдельных гистологических препаратах — тотальный некроз с полным нарушением балочного строения долек (стадия F6). На рис. 1, f представлены количественные изменения площади соединительной ткани на разных стадиях эксперимента.

По мере прогрессирования фиброза печени скорость разрастания площади волокнистой соединительной ткани была неодинаковой (см. рис. 1, f). До наступления стадии F5A/F5B происходил постепенный её рост (переход фиброза в цирроз, стадии F5A/F5B, 11 нед), а затем — более интенсивное повышение этого показателя. По завершении 17 нед площадь соединительной ткани увеличилась в 14 раз ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой.

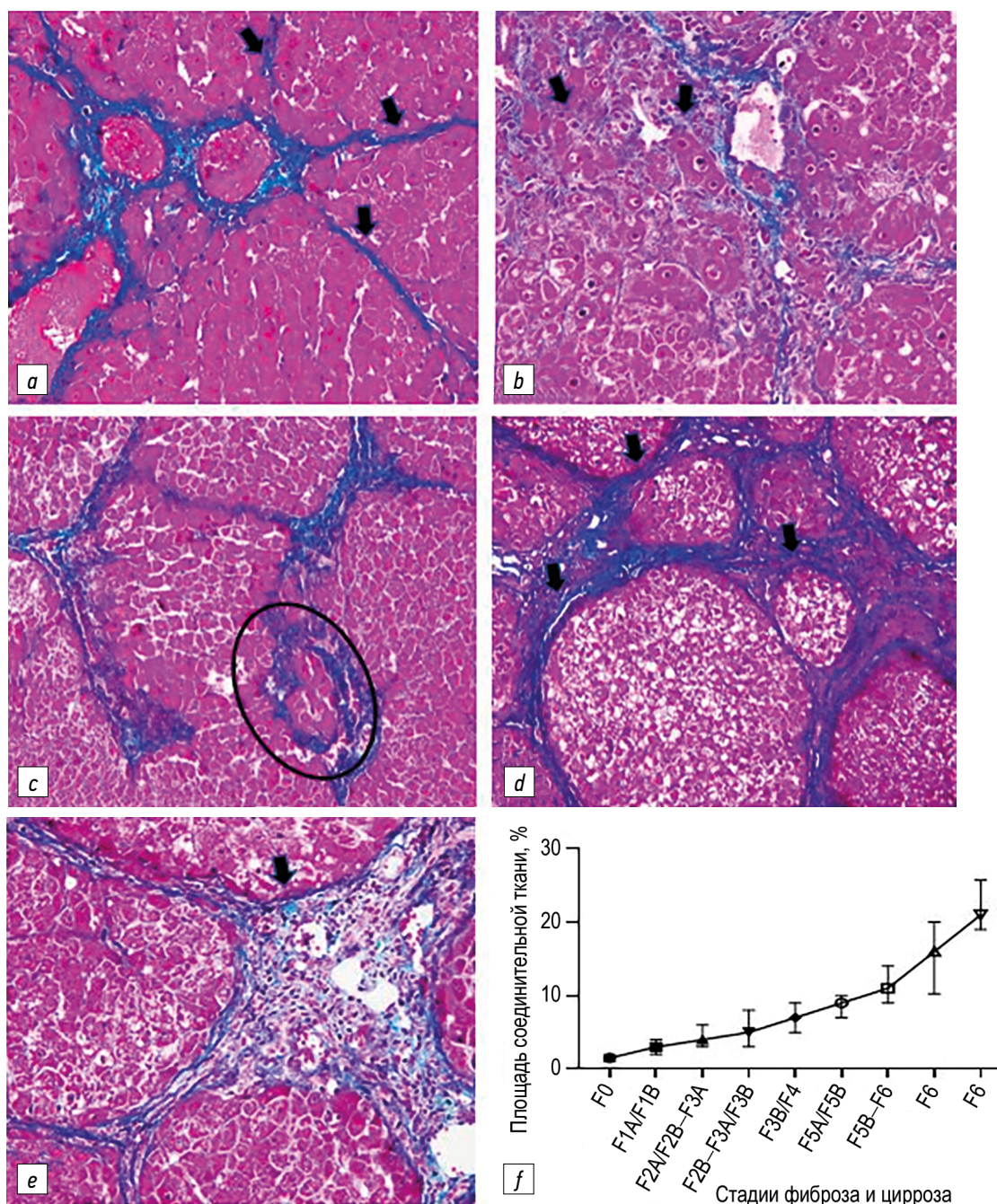


Рис. 1. Печень крыс через 5 (*a, b*), 9 (*c*), 13 (*d*), 17 (*e*) нед после начала эксперимента, количественные изменения площади соединительной ткани: *a* — фиброзные соединительнотканые септы (стрелки); *b* — перисинусоидный фиброз (стрелки); *c* — ложная печёночная долька (овальная рамка); *d* — ложные печёночные дольки (стрелки); *e* — толстая фиброзная соединительнотканная септа (стрелка); *f* — изменение площади соединительной ткани на разных стадиях эксперимента. Окраска по Маллори; $\times 100$ (*d*), $\times 200$ (*a, c, e*), $\times 400$ (*b*).

Fig. 1. Rats' liver after 5 (*a, b*), 9 (*c*), 13 (*d*), 17 (*e*) weeks after the start of the experiment, quantitative changes in the area of connective tissue: *a* — fibrous connective tissue septa (arrows); *b* — perisinusoidal fibrosis (arrows); *c* — false hepatic lobule (oval frame); *d* — false hepatic lobules (arrows); *e* — thick fibrous connective tissue septa (arrow); *f* — change in the area of connective tissue at different stages of the experiment. Mallory staining; $\times 100$ (*d*), $\times 200$ (*a, c, e*), $\times 400$ (*b*).

Фиброз и цирроз печени у крыс сопровождался патологическим венозным ангиогенезом. Он проявлялся формированием множества мелких кровеносных сосудов венозного типа: венул и мелких вен (рис. 2, *a*). В некоторых гистологических срезах встречались очаговые и диффузно локализованные расширения синусоидных

капилляров. Наряду с этим иногда создавалось впечатление сдавленности синусоидных капилляров из-за гипертрофии гепатоцитов. Большинство сосудов были заполнены эритроцитами, при этом отдельные из них имели выраженное полнокровие. Одновременно с выявленными изменениями встречались зоны, в которых

кровеносное наполнение сосудов практически соответствовало норме. В ходе эксперимента установлено увеличение площади междольковых вен; к середине эксперимента (9 нед, стадия фиброза F3B/F4) в большинстве случаев они имели гигантский размер и неправильную форму со множеством лакун в их составе (см. рис. 2, *b*). Количественные изменения площади междольковых вен отражены на рис. 2, *c*. Как видно из рисунка, площадь междольковых вен превышала контрольный показатель на протяжении всего эксперимента. Через 3 нед (стадия фиброза F1A/F1B) площадь междольковых вен увеличилась в 1,56 раза ($p < 0,001$), в период начальной стадии узловой перестройки паренхимы (9 нед, стадия фиброза F3B/F4) — в 7,0 раза ($p < 0,001$), а к концу эксперимента (17 нед, стадия фиброза F6) — в 72,0 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой.

Клетки, экспрессирующие маркеры FAP и α -SMA. Результаты собственных исследований показали, что в печени крыс существуют одновременно две морфологически неоднородные популяции миофибробластов, экспрессирующие различные типы маркеров (FAP, α -SMA). При прогрессирующем фиброзе печени на стадиях F1A/F1B–F3B/F4 (3–9 нед) клетки α -SMA⁺ и FAP⁺ отличались своим местоположением. Клетки α -SMA⁺ находились преимущественно в стенке синусоидных капилляров и в очагах некроза. Изредка они определялись в соединительнотканых септах. Клетки FAP⁺ на стадии портального фиброза F1A/F1B располагались вокруг междольковых сосудов и вблизи междольковых желчных протоков. С наступлением стадии фиброза F2A/F2B–F3A происходило направленное разрастание волокнистой соединительной ткани с наличием клеток FAP⁺, которые брали начало от двух противоположных портальных зон, идущих навстречу друг другу и пронизывающих дольку печени. Таким образом, выстраивался путь, по которому происходили синтез волокнистого компонента соединительной ткани и формирование соединительнотканых мостов — мостовидный фиброз. На стадиях фиброза и цирроза (F5B–F6, F6) клетки α -SMA⁺ (рис. 3, *a*) и FAP⁺ (рис. 3, *b*) располагались в стенке синусоидных капилляров, вокруг сосудов, вблизи желчных протоков портальных зон и между волокнами фиброзной ткани. Изменение количества клеток FAP⁺, α -SMA⁺ показано на рис. 4, *a* и *b* соответственно.

Спустя 5 нед эксперимента (F2A/F2B–F3A) число клеток FAP⁺ увеличилось в 1,7 раза ($p = 0,021$), а α -SMA⁺ — статистически значимо не изменилось ($p = 0,3075$) по сравнению с 3-й неделей эксперимента. В последующем процесс прогрессирования фиброза и цирроза печени крыс характеризовался ростом числа данных популяций клеток. На стадии фиброза F2B–F3A/F3B (7 нед) число клеток FAP⁺ выросло в 2,21 раза ($p < 0,001$), α -SMA⁺ — в 2,45 раза ($p < 0,001$), а к концу эксперимента (F6, 17 нед) — в 5,4 раза ($p < 0,001$) и 7,64 раза ($p < 0,001$) соответственно по сравнению с 3-й неделей.

Экспрессия мРНК исследуемых генов *Vegfa* и *Yap1*. Изменения уровня мРНК генов *Vegfa* и *Yap1* отражены на рис. 5, *a* и *b* соответственно.

На протяжении всего эксперимента наблюдали снижение экспрессии мРНК *Vegfa* в пределах от 2,90 раза ($p < 0,001$; стадия фиброза F5A/F5B, 11 нед) до 5,27 раза ($p < 0,001$; стадия фиброза F6, 15 нед) по сравнению с контрольной точкой. Падение уровня мРНК *Yap1* колебалось в диапазоне от 1,70 раза ($p < 0,001$; стадия фиброза F1A/F1B, 3 нед) до 5,60 раза ($p < 0,001$; стадии фиброза F5A/F5B, 11 нед) по сравнению с контрольной точкой.

Математическая модель формирования цирроза печени. Для разработки математической модели формирования цирроза печени при доклинических испытаниях мы выбрали 13-ю (стадия фиброза F5A/F5B, неполный цирроз) и 15-ю (F6, полный цирроз) недели эксперимента.

При анализе распределения установлено, что два из шести изучаемых показателей имели распределение, отличное от нормального хотя бы в одной из сравниваемых групп, — уровень мРНК *Yap1* и площадь междольковых вен (уровень значимости для критерия Шапиро–Уилка $p < 0,05$). Кроме того, три из шести изучаемых показателей не имели равных дисперсий — площадь соединительной ткани, экспрессия мРНК *Vegfa* и мРНК *Yap1* (уровень значимости для критерия Левена $p < 0,05$). Поэтому при сопоставлении групп использовали критерии, не предъявляющие требований к характеру распределения показателей.

Между анализируемыми группами определены значимые различия по значениям таких показателей, как клетки FAP⁺, клетки α -SMA⁺, мРНК *Vegfa* и мРНК *Yap1* при использовании критерия Вилкоксона (табл. 1).

В связи с наличием значимой корреляции средней силы по Спирмену между показателями клеток FAP⁺ и клеток α -SMA⁺ ($r = 0,369$; $p = 0,027$), клеток α -SMA⁺ и мРНК *Yap1* ($r = -0,375$; $p = 0,024$) а также между мРНК *Vegfa* и мРНК *Yap1* ($r = 0,548$; $p < 0,001$) для построения модели использовали взаимно не коррелирующие показатели.

При создании математической модели решалась задача классификации наблюдений по стадиям, представленным в виде качественной бинарной переменной (фиброз/цирроз). Поскольку не выполнялись условия применения дискриминантного анализа (нормальное распределение значений показателей и равенство дисперсий), для построения модели был использован метод множественной логистической регрессии с пошаговым отбором предикторов. В результате создана модель на основе двух показателей: клетки FAP⁺ и мРНК *Yap1*. Модель была статистически значимой и приемлемого качества (хи-квадрат — 19,1; $p = 0,0001$; R-квадрат Кокса и Снелла — 0,41; R-квадрат Нэйджелкерка — 0,55). Характеристики коэффициентов модели представлены в табл. 2.

Проверка согласия Хосмера–Лемешева подтвердила приемлемое качество модели (значение хи-квадрат — 4,1; $p = 0,762$ при 7 степенях свободы). Распределение

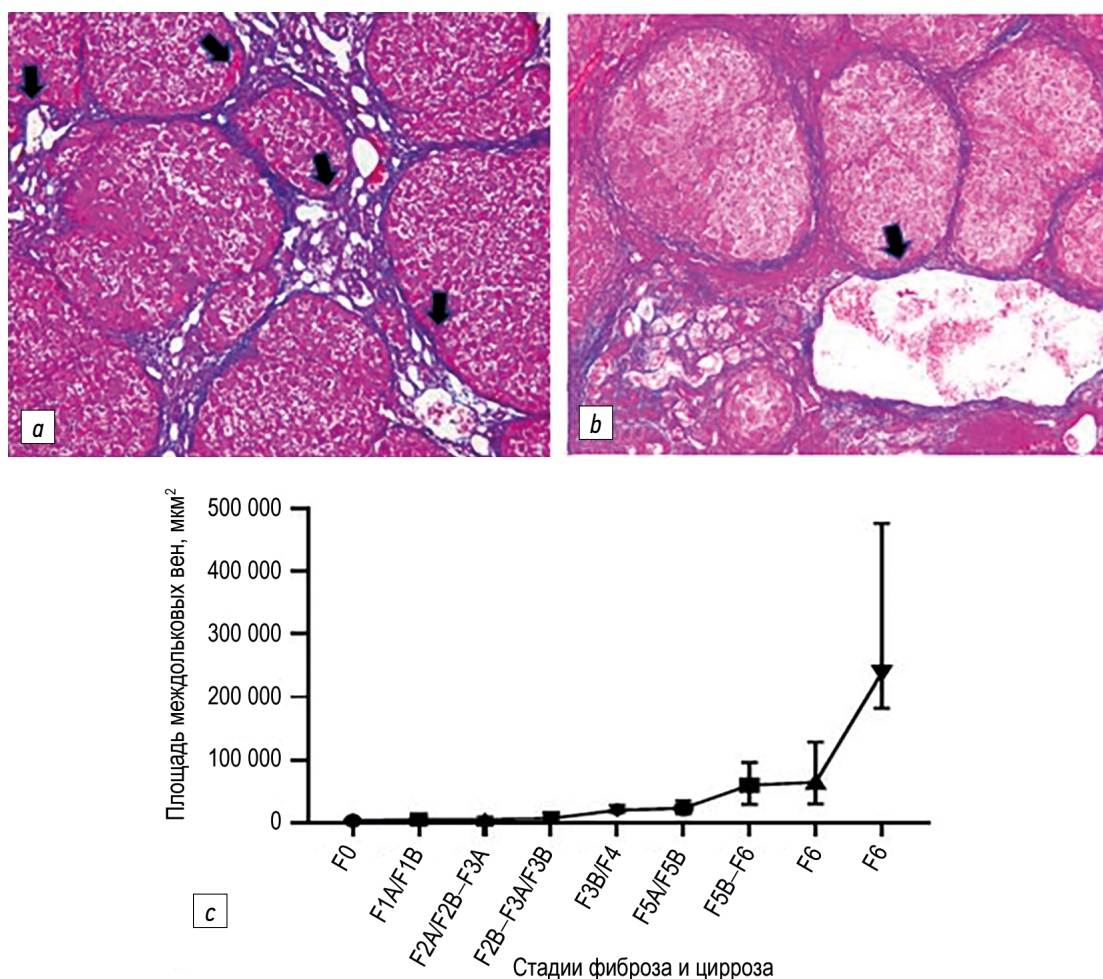


Рис. 2. Гистологические препараты печени крыс через 13 нед после начала эксперимента, количественные изменения площади междольковых вен: *a* — венозный ангиогенез (стрелки); *b* — междольковая вена (стрелка); *c* — изменение площади междольковых вен на разных стадиях эксперимента. Окраска по Маллори; $\times 100$.

Fig. 2. Histological preparations of rat liver 13 weeks after the start of the experiment, quantitative changes in the area of interlobular veins: *a* — venous angiogenesis (arrows); *b* — interlobular vein (arrow); *c* — change in the area of interlobular veins at different stages of the experiment. Mallory staining; $\times 100$.

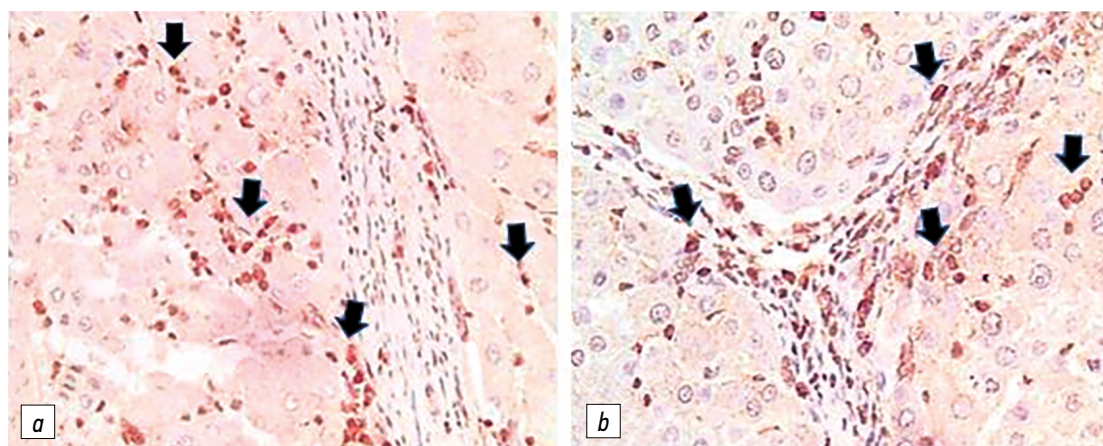


Рис. 3. Печень крыс через 13 нед после начала эксперимента: *a* — α -SMA⁺ клетки (стрелки); *b* — FAP⁺ клетки (стрелки). Иммуногистохимическое окрашивание на α -SMA (*a*); на FAP (*b*), докраска гематоксилином Майера; $\times 200$ (*a*), $\times 400$ (*b*).

Fig. 3. Rats' liver after 13 weeks after the start of the experiment: *a* — α -SMA⁺ cells (arrows); *b* — FAP⁺ cells (arrows). Immunohistochemical staining for α -SMA (*a*); on FAP (*b*), counterstaining with Mayer's hematoxylin; $\times 200$ (*a*), $\times 400$ (*b*).

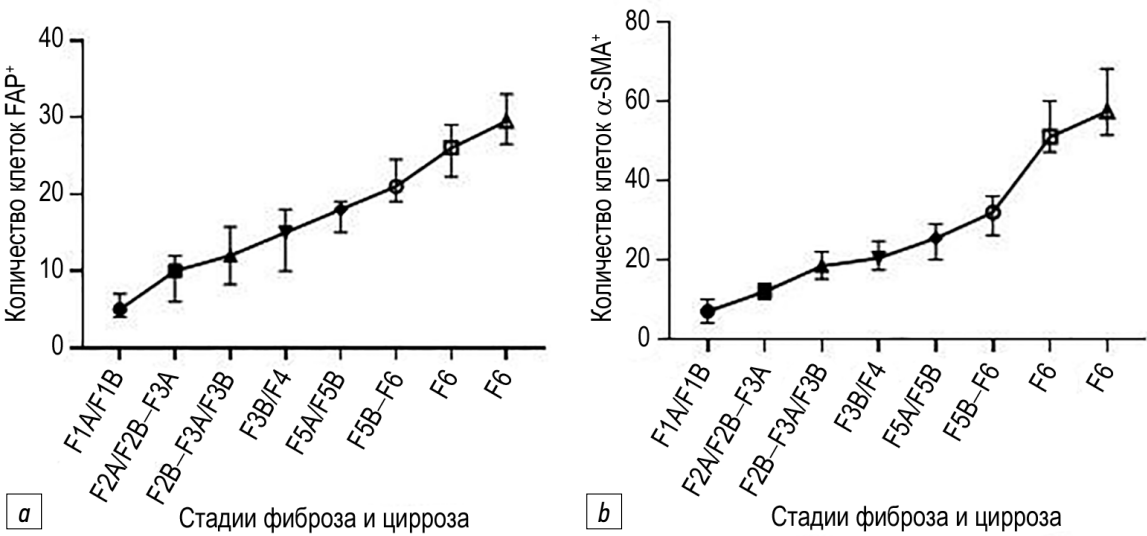


Рис. 4. Изменение количества клеток FAP⁺ (a) и α-SMA⁺ (b) на разных стадиях эксперимента.
Fig. 4. Change in the number of FAP⁺ (a) and α-SMA⁺ (b) cells at different stages of the experiment.

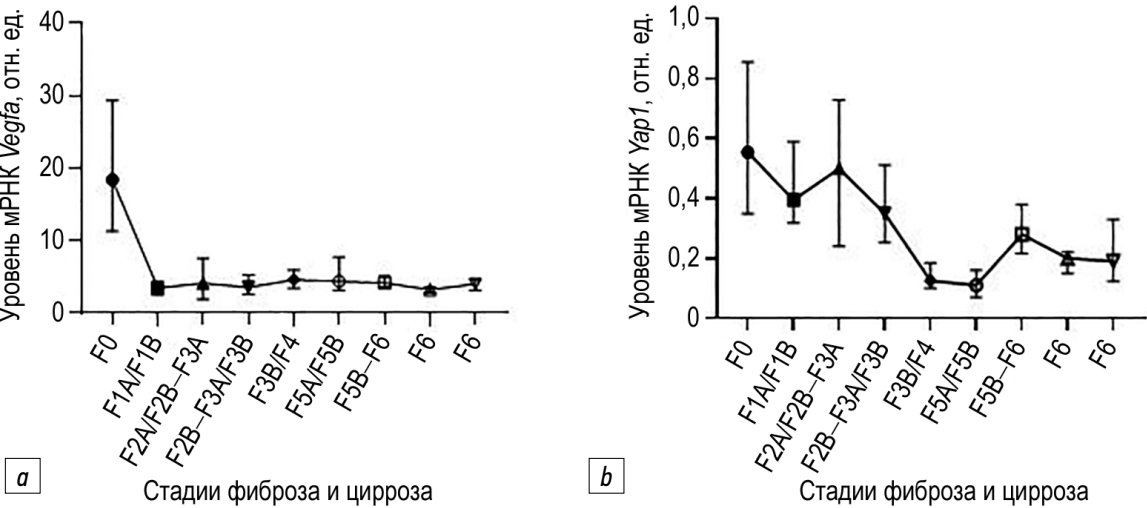


Рис. 5. Изменение уровня мРНК генов Vegfa (a) и Yap1 (b) на разных стадиях эксперимента.
Fig. 5. Changes in the mRNA levels of the Vegfa (a) and Yap1 (b) genes at different stages of the experiment.

Таблица 1. Анализ различий по значениям показателей между анализируемыми группами, Ме [25%; 75%]
Table 1. Analysis of differences in indicator values between the analyzed groups (Me [25%; 75%])

Показатели	Стадия фиброза F5A/F5B, неполный цирроз (n=18)	Стадия F6, полный цирроз (n=18)	Уровень значимости p для критерия Вилкоксона
Площадь соединительной ткани, %	14 [12; 16]	18,5 [12,0; 21,0]	0,035
Клетки FAP ⁺ , n	21 [19; 24]	26 [23; 29]	0,049
Клетки α-SMA ⁺ , n	32 [27; 36]	51 [48; 59]	<0,001
мРНК Vegfa, отн. ед.	4,1 [3,7; 4,9]	3,2 [2,8; 3,5]	0,006
мРНК Yap1, отн. ед.	0,28 [0,22; 0,38]	0,20 [0,15; 0,22]	0,007
Площадь междольковых вен, мкм ²	56 519 [28 301; 100 184]	36 424 [24 729; 90 055]	0,420

Таблица 2. Результаты множественной логистической регрессии
Table 2. Multiple logistic regression results

Показатель	Коэффициент β	Стандартная ошибка	Статистика Вальда	Уровень значимости p	EXP (β)	95% ДИ	
						+95%	–95%
Клетки FAP ⁺ , n	0,25	0,11	4,88	0,027	1,29	1,03	1,61
мРНК <i>Yap1</i> , отн. ед.	–20,86	7,76	7,23	0,007	$0,87 \times 10^{-9}$	$0,22 \times 10^{-15}$	0,004
Константа	–0,73	2,51	0,09	0,771	0,48	—	—

Таблица 3. Результаты классификации наблюдений на основе модели
Table 3. Results of classification of observations based on the model

Стадия	Прогнозируемая стадия		Верно классифицированные наблюдения, %
	Фиброз, n	Цирроз, n	
Фиброз	13	5	72,22
Цирроз	4	14	77,78
Верно классифицированные наблюдения, %			75,0

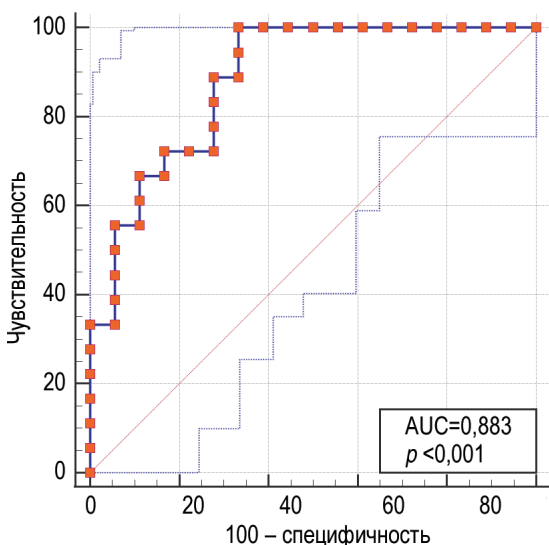


Рис. 6. ROC-кривая на основе рассчитанных значений уравнения логистической регрессии.
Fig. 6. ROC curve based on the calculated values of the logistic regression equation.

остатков не отличалось от нормального, $p=0,406$ для критерия Шапиро–Уилка.

Итоговая модель для определения стадии цирроза имеет следующий вид:

$$P=1/(1+\text{EXP}(0,73-0,25 \cdot X_1+20,86 \cdot X_2)),$$

где X_1 — клетки FAP⁺; X_2 — мРНК *Yap1*.

Значение P соответствует вероятности наличия цирроза. При значениях P от 0 до 0,5 стадия классифицируется как фиброз, при значениях P от 0,5 до 1 определяется стадия цирроза. Разработанная модель характеризовалась чувствительностью 77,78 (95% ДИ:

52,4–93,6) и специфичностью 72,22 (95% ДИ: 46,5–90,3) при уровне значимости $p=0,0007$ (табл. 3).

Для оценки качества полученной математической модели на основе двух показателей (клетки FAP⁺ и мРНК *Yap1*) использовали ROC-анализ (рис. 6).

Площадь под ROC-кривой (AUC) составила 0,883, статистическая ошибка — 0,056, 95% ДИ: 0,732–0,966.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время большинство исследователей считают, что прогрессирование фиброза печени обусловлено гетерогенной популяцией миофибробластов [21–23]. Результаты собственных исследований [11] показали, что в печени крыс существуют одновременно две морфологически неоднородные популяции миофибробластов. Общеизвестно, что основной функцией фибробластов является синтез внеклеточного матрикса. Предположительно сигналы от изменённого состояния микроокружения активируют портальные фибробласты в фенотип FAP⁺, и они первыми стремятся синтезировать внеклеточный матрикс в портальных зонах, а также, возможно, они регулируют его уровень секреции, участвуя таким образом в формировании фиброзных септ (мостов). Вне всякого сомнения, процесс узловых трансформации паренхимы также начинается вблизи печёночных триад.

Предположительно клетки α -SMA⁺ вступают в роль миофибробластов позже. Вероятнее всего, этап активации и трансдифференцировки звёздчатых клеток печени более продолжительный по сравнению с портальными фибробластами или задействованные молекулярные сигналы, регулирующие смену фенотипа клеток, включаются с опозданием либо ингибируются до какого-то определённого момента. Основным местом локализации

звёздчатых клеток являются стенки синусоидных капилляров. На начальных этапах клетки α -SMA⁺ отвечают за перичеллюлярный фиброз и синтез волокнистой соединительной ткани в очагах некроза.

Известно, что потеря пор синусоидных эндотелиальных клеток сопровождается синтезом ими широкого спектра цитокинов и хемокинов, способных активировать звёздчатые клетки. Кроме того, повреждённые гепатоциты, высвобождая DAMPs (молекулярный фрагмент, ассоциированный с повреждениями), могут дополнительно стимулировать эти клетки. Эпителиальные клетки желчных протоков экспрессируют профиброгенные факторы (TGF- β , PDGF), способные активировать портальные фибробласты [24–26]. Вероятнее всего, процессы активации портальных фибробластов и звёздчатых клеток регулируются сочетанием сложных механизмов, которые требуют дополнительных исследований.

По мнению ряда авторов, патологический ангиогенез сопровождается ростом сосудов, что усугубляет тяжесть протекания фиброза и цирроза [27]. В современной научной литературе показано, что VEGF может выступать инициатором активации, миграции эндотелиальных клеток, формирования и функционирования вновь сформированных сосудов. Сигнальный путь Notch выполняет ключевую роль во время эмбрионального васкулогенеза. В ряде работ отмечается его связь с VEGF при патологическом ангиогенезе [28, 29]. Предполагается, что ген *Yap1* (входит в сигнальный путь Hippo) является Notch-зависимым геном и запускает активацию звёздчатых клеток печени [30]. Результаты настоящего исследования показали, что уровни экспрессии мРНК *Vegfa* и *Yap1* на протяжении всего эксперимента были ниже контрольного значения. Это может свидетельствовать об их участии в патологическом ангиогенезе и фиброгенезе.

Таким образом, в результате проведённого анализа разработана модель формирования цирроза печени. Модель построена с использованием логистической регрессии, основана на значениях двух показателей (клетки FAP⁺ и мРНК *Yap1*) и характеризуется хорошим качеством. Полученное значение площади под ROC-кривой 0,883 свидетельствует о хороших результатах классификации случаев. Модель формирования цирроза печени потенциально может быть использована для доклинических испытаний антифибротических лекарственных средств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная математическая модель позволяет определить переход со стадии фиброза в стадию цирроза печени при проведении доклинических исследований. Способ заключается в том, что у лабораторного животного индуцируют фиброзные изменения печени интрагастральным введением гепатотоксического препарата в дозе 200 мг/кг массы тела 2 раза в неделю в течение 16–18 нед, после выведения из эксперимента выполняют забор

образцов печени диаметром 5–10 мм для морфологического и не более 5 мм — для молекулярно-генетического исследования. При морфологическом исследовании определяют количество клеток, экспрессирующих белок активации фибробластов FAP, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени определяют уровень экспрессии мРНК гена *Yap1*, причём стадию фиброзных изменений печени рассчитывают по формуле $P=1/(1+\exp(0,73-0,25\cdot X_1+20,86\cdot X_2))$, где X_1 — число клеток, экспрессирующих белок активации фибробластов FAP; X_2 — уровень экспрессии мРНК *Yap1*. При значениях P до 0,5 определяют стадию фиброза, при значениях $P=0,5$ — точку перехода стадии фиброза печени в стадию цирроза, при значениях P от 0,5 до 1 — стадию цирроза.

Использование полученной модели при проведении доклинических испытаний новых антифибротических лекарственных средств позволит повысить эффективность таких испытаний в области экспериментальной гепатологии и фармакологии. Кроме того, модель может быть полезна при изучении патогенеза фиброза и цирроза печени и определения новых потенциальных молекулярных мишеней для антифибротической терапии. Немаловажным аспектом является снижение числа дорогостоящих, трудоёмких лабораторных исследований за счёт того, что при проведении доклинических исследований будет использоваться два маркера: белок FAP и уровень экспрессии мРНК *Yap1*.

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. 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.) Наибольший вклад распределён следующим образом: Е.И. Лебедева, А.Т. Щастный, А.С. Бабенко — разработка дизайна исследования, проведение исследований, анализ данных, написание и редактирование текста статьи; Д.А. Зиновкин, Э.А. Надыров — проведение исследований, редактирование статьи; В.Н. Мартинков — анализ данных, редактирование статьи.

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. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis,

interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work. E.I. Lebedeva, A.T. Shchastnyi, A.S. Babenka — development of research design, conducting research, data analysis, writing and editing the text of the article; D.A. Zinovkin, E.A. Nadyrov — conducting research, editing the article; V.N. Martinkov — data analysis, article editing.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Huang D.Q., Terrault N.A., Tacke F., et al. Global epidemiology of cirrhosis — aetiology, trends and predictions // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2023. Vol. 20, N 6. P. 388–398. doi: 10.1038/s41575-023-00759-2
- Jangra A., Kothari A., Sarma P., et al. Recent advancements in antifibrotic therapies for regression of liver fibrosis // *Cells*. 2022. Vol. 11, N 9. P. 1500. doi: 10.3390/cells11091500
- Cakaloglu Y. Alcohol-related medicosocial problems and liver disorders: Burden of alcoholic cirrhosis and hepatocellular carcinoma in Turkiye // *Hepatol Forum*. 2023. Vol. 4, N 1. P. 40–46. doi: 10.14744/hf.2022.2022.0045
- 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. 9671. doi: 10.3390/ijms24119671
- Liu C., Hou X., Mo K., et al. Serum non-coding RNAs for diagnosis and stage of liver fibrosis // *J Clin Lab Anal*. 2022. Vol. 36, N 10. P. e24658. doi: 10.1002/jcla.24658
- Guindi M. Liver fibrosis: the good, the bad, and the patchy — an update // *Hum Pathol*. 2023. Vol. 141. P. 201–211. doi: 10.1016/j.humpath.2023.01.002
- Kolaric T.O., Kuna L., Covic M., et al. Preclinical models and promising pharmacotherapeutic strategies in liver fibrosis: an update // *Curr Issues Mol Biol*. 2023. Vol. 45, N 5. P. 4246–4260. doi: 10.3390/cimb45050270
- Krylov D.P., Rodimova S.A., Karabut M.M., Kuznetsova D.S. experimental models for studying structural and functional state of the pathological liver (review) // *Sovrem Tekhnologii Med*. 2023. Vol. 15, N 4. P. 65–82. doi: 10.17691/stm2023.15.4.06
- Lee H.J., Mun S.J., Jung C.R., et al. In vitro modeling of liver fibrosis with 3D co-culture system using a novel human hepatic stellate cell line // *Biotechnol Bioeng*. 2023. Vol. 120, N 5. P. 1241–1253. doi: 10.1002/bit.28333
- Lee Y.S., Seki E. In vivo and in vitro models to study liver fibrosis: mechanisms and limitations // *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2023. Vol. 16, N 3. P. 355–367. doi: 10.1016/j.jcmgh.2023.05.010
- Лебедева Е.И., Щастный А.Т., Бабенко А.С. Модель токсического фиброза у крыс линии wistar: морфологические и молекулярно-генетические параметры точки перехода в цирроз // *Гены и клетки*. 2023. Т. 18, № 3. С. 219–234. EDN: HTSXYA doi: 10.23868/gc546031
- Красочко П.А., Щастный А.Т., Лебедева Е.И., и др. Методические рекомендации по созданию экспериментальной модели токсического фиброза и цирроза, индуцированного тиоацетамидом. Минск: РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», 2021. 13 с. EDN: ZNOOHG
- Лебедева Е.И., Красочко П.А., Щастный А.Т., и др. Рекомендации по оценке прогрессирования и регресса токсического фиброза печени в доклинических исследованиях. Минск: РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», 2023. 8 с. EDN: LSMJUD
- Lay A.J., Zhang H.E., McCaughan G.W., Gorrell M.D. Fibroblast activation protein in liver fibrosis // *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2019. Vol. 24, N 1. P. 1–17. doi: 10.2741/4706
- Yang A.T., Kim Y.O., Yan X.Z., et al. Fibroblast activation protein activates macrophages and promotes parenchymal liver inflammation and fibrosis // *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2023. Vol. 15, N 4. P. 841–867. doi: 10.1016/j.jcmgh.2022.12.005
- Shi Y., Kong Z., Liu P., et al. Oncogenesis, microenvironment modulation and clinical potentiality of FAP in glioblastoma: lessons learned from other solid tumors // *Cells*. 2021. Vol. 10, N 5. P. 1142. doi: 10.3390/cells10051142
- 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
- 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
- Xiang D., Zou J., Zhu X., et al. Physalin D attenuates hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by blocking TGF- β /Smad and YAP signaling // *Phytomedicine*. 2020. Vol. 78. P. 153294. doi: 10.1016/j.phymed.2020.153294
- Dai Y., Hao P., Sun Z., et al. Liver knockout YAP gene improved insulin resistance-induced hepatic fibrosis // *J Endocrinol*. 2021. Vol. 249, N 2. P. 149–161. doi: 10.1530/JOE-20-0561
- Kamm D.R., McCommis K.S. Hepatic stellate cells in physiology and pathology // *J Physiol*. 2022. Vol. 600, N 8. P. 1825–1837. doi: 10.1113/JP281061
- O'Hara S.P., LaRusso N.F. Portal fibroblasts: A renewable source of liver myofibroblasts // *Hepatology*. 2022. Vol. 76, N 5. P. 1240–1242. doi: 10.1002/hep.32528
- Kim H.Y., Sakane S., Eguileor A., et al. The origin and fate of liver myofibroblasts // *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2024. Vol. 17, N 1. P. 93–106. doi: 10.1016/j.jcmgh.2023.09.008
- Wu Y., Li Z., Xiu A.Y., et al. Carvedilol attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis and hepatic sinusoidal capillarization in mice // *Drug Des Devel Ther*. 2019. Vol. 13. P. 2667–2676. doi: 10.2147/DDDT.S210797
- Sato K., Marziani M., Meng F., et al. Ductular reaction in liver diseases: pathological mechanisms and translational significances // *Hepatology*. 2019. Vol. 69, N 1. P. 420–430. doi: 10.1002/hep.30150

Corrected and republished from: *Hepatology*. 2019. Vol. 70, N 3. P. 1089. doi: 10.1002/hep.30878

26. Acharya P., Chouhan K., Weiskirchen S., Weiskirchen R. Cellular mechanisms of liver fibrosis // *Front Pharmacol.* 2021. Vol. 12. P. 671640. doi: 10.3389/fphar.2021.671640
27. 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
28. 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

REFERENCES

1. Huang DQ, Terrault NA, Tacke F, et al. Global epidemiology of cirrhosis — aetiology, trends and predictions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2023;20(6):388–398. doi: 10.1038/s41575-023-00759-2
2. Jangra A, Kothari A, Sarma P, et al. Recent advancements in antifibrotic therapies for regression of liver fibrosis. *Cells.* 2022;11(9):1500. doi: 10.3390/cells11091500
3. Cakaloglu Y. Alcohol-related medicosocial problems and liver disorders: Burden of alcoholic cirrhosis and hepatocellular carcinoma in Türkiye. *Hepatol Forum.* 2023;4(1):40–46. doi: 10.14744/hf.2022.2022.0045
4. 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
5. Liu C, Hou X, Mo K, et al. Serum non-coding RNAs for diagnosis and stage of liver fibrosis. *J Clin Lab Anal.* 2022;36(10):e24658. doi: 10.1002/jcla.24658
6. Guindi M. Liver fibrosis: the good, the bad, and the patchy—an update. *Hum Pathol.* 2023;141:201–211. doi: 10.1016/j.humpath.2023.01.002
7. Kolaric TO, Kuna L, Covic M, et al. Preclinical models and promising pharmacotherapeutic strategies in liver fibrosis: an update. *Curr Issues Mol Biol.* 2023;45(5):4246–4260. doi: 10.3390/cimb45050270
8. Krylov DP, Rodimova SA, Karabut MM, et al. Experimental models for studying structural and functional state of the pathological liver (review). *Sovremennyye tehnologii v medicine.* 2023;15(4):65. doi: 10.17691/stm2023.15.4.06
9. Lee HJ, Mun SJ, Jung CR, et al. In vitro modeling of liver fibrosis with 3D co-culture system using a novel human hepatic stellate cell line. *Biotechnol Bioeng.* 2023;120(5):1241–1253. doi: 10.1002/bit.28333
10. Lee YS, Seki E. In vivo and In vitro models to study liver fibrosis: mechanisms and limitations. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2023;16(3):355–367. doi: 10.1016/j.jcmgh.2023.05.010
11. Lebedeva EI, Shchastniy AT, Babenka AS. Model of toxic fibrosis in Wistar rats: morphological and molecular-genetic parameters of the transition point to cirrhosis. *Genes & cells.* 2023;18(3):219–234. EDN: HTSXYA doi: 10.23868/gc546031
12. Krasochko PA, Shchastniy AT, Lebedeva EI, et al. *Methodological recommendations for creating an experimental model of toxic fibrosis and cirrhosis induced by thioacetamide.* Minsk: Republican Unitary Enterprise “Institute of Experimental Veterinary Medicine named after. S.N. Vysheslesskogo”; 2021. 13 p. (In Belarus.) E DN: ZNOOHG
13. Lebedeva EI, Krasochko PA, Shchastniy AT, et al. *Recommendations for assessing the progression and regression of toxic liver fibrosis in preclinical studies.* Minsk: “Institute of Experimental Veterinary Medicine named after. S.N. Vysheslesskogo”, 2023. 8 p. (In Belarus.) EDN: LSMJUD
14. Lay AJ, Zhang HE, McCaughan GW, Gorrell MD. Fibroblast activation protein in liver fibrosis. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2019;24(1):1–17. doi: 10.2741/4706
15. Yang AT, Kim YO, Yan XZ, et al. Fibroblast activation protein activates macrophages and promotes parenchymal liver inflammation and fibrosis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2023;15(4):841–867. doi: 10.1016/j.jcmgh.2022.12.005
16. Shi Y, Kong Z, Liu P, et al. Oncogenesis, microenvironment modulation and clinical potentiality of fap in glioblastoma: lessons learned from other solid tumors. *Cells.* 2021;10(5):1142. doi: 10.3390/cells10051142
17. 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
18. Lin Y, Dong MQ, Liu ZM, et al. A strategy of vascular-targeted therapy for liver fibrosis. *Hepatology.* 2022;76(3):660–675. doi: 10.1002/hep.32299
19. Xiang D, Zou J, Zhu X, et al. Physalin D attenuates hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by blocking TGF- β /Smad and YAP signaling. *Phytomedicine.* 2020;78:153294. doi: 10.1016/j.phymed.2020.153294
20. Dai Y, Hao P, Sun Z, et al. Liver knockout YAP gene improved insulin resistance-induced hepatic fibrosis. *J Endocrinol.* 2021;249(2):149–161. doi: 10.1530/JOE-20-0561
21. Kamm DR, McCommis KS. Hepatic stellate cells in physiology and pathology. *J Physiol.* 2022;600(8):1825–1837. doi: 10.1113/JP281061
22. O'Hara SP, LaRusso NF. Portal fibroblasts: A renewable source of liver myofibroblasts. *Hepatology.* 2022;76(5):1240–1242. doi: 10.1002/hep.32528
23. Kim HY, Sakane S, Eguileor A, et al. The origin and fate of liver myofibroblasts. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2023; 17(1):93–106. doi: 10.1016/j.jcmgh.2023.09.008
24. Wu Y, Li Z, Xiu AY, et al. Carvedilol attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis and hepatic sinusoidal capillarization in mice. *Drug Des Devel Ther.* 2019;13:2667–2676. doi: 10.2147/DDDT.S210797
25. Sato K, Marziani M, Meng F. Ductular reaction in liver diseases: pathological mechanisms and translational significances. *Hepatology.* 2019;69(1):420–430. doi: 10.1002/hep.30150 Corrected and republished from: *Hepatology.* 2019;70(3):1089. doi: 10.1002/hep.30878
26. Acharya P, Chouhan K, Weiskirchen S, Weiskirchen R. Cellular mechanisms of liver fibrosis. *Front Pharmacol.* 2021;12:671640. doi: 10.3389/fphar.2021.671640
27. 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
29. Zhang W., Han L., Wen Y., et al. Electroacupuncture reverses endothelial cell death and promotes angiogenesis through the VEGF/Notch signaling pathway after focal cerebral ischemia-reperfusion injury // *Brain Behav.* 2023. Vol. 13, N 3. P. e2912. doi: 10.1002/brb3.2912
30. Du K., Maeso-Díaz R., Oh S.H., et al. Targeting YAP-mediated HSC death susceptibility and senescence for treatment of liver fibrosis // *Hepatology.* 2023. Vol. 77, N 6. P. 1998–2015. doi: 10.1097/HEP.0000000000000326

28. 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

29. Zhang W, Han L, Wen Y, et al. Electroacupuncture reverses endothelial cell death and promotes angiogenesis through the VEGF/

Notch signaling pathway after focal cerebral ischemia-reperfusion injury. *Brain Behav.* 2023;13(3):e2912. doi: 10.1002/brb3.2912

30. Du K, Maeso-Díaz R, Oh SH, et al. Targeting YAP-mediated HSC death susceptibility and senescence for treatment of liver fibrosis. *Hepatology.* 2023;77(6):1998–2015. doi: 10.1097/HEP.000000000000326

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

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

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

Мартинков Виктор Николаевич, канд. биол. наук, доцент;
ORCID: 0000-0001-7029-5500;
eLibrary SPIN: 4319-8597;
e-mail: martinkov@rcrm.by

Зиновкин Дмитрий Александрович, канд. биол. наук, доцент;
ORCID: 0000-0002-3808-8832;
eLibrary SPIN: 1531-9214;
e-mail: zinovkin_da@gsmu.by

Надыров Эльдар Аркадьевич, канд. мед. наук, доцент;
ORCID: 0000-0002-0896-5611;
eLibrary SPIN: 8176-2029;
e-mail: nadyrov2006@rambler.ru

AUTHORS' INFO

* **Elena I. Lebedeva**, Cand. Sci. (Biology), Assistant 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

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

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

Victor N. Martinkov, Cand. Sci. (Biology), Assistant Professor;
ORCID: 0000-0001-7029-5500;
eLibrary SPIN: 4319-8597;
e-mail: martinkov@rcrm.by

Dmitry A. Zinovkin, Cand. Sci. (Biology), Assistant Professor;
ORCID: 0000-0002-3808-8832;
eLibrary SPIN: 1531-9214;
e-mail: zinovkin_da@gsmu.by

Eldar A. Nadyrov, MD, Cand. Sci. (Medicine), Assistant Professor;
ORCID: 0000-0002-0896-5611;
eLibrary SPIN: 8176-2029;
e-mail: nadyrov2006@rambler.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author