

DOI: <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2022.3.17>

Потенциал точки перехода фиброза в цирроз как ключевого элемента в изучении роли сигнального пути Tweak/Fn14 при индуцированном фиброгенезе печени крыс

Е.И. Лебедева¹, А.С. Бабенко², А.Т. Щастный¹

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

²Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2022. – Том 21, №3. – С. 17-26.

The potential of the fibrosis/cirrhosis transition point as a key element for studying the role of the Ttweak/Fn14 signaling pathway in induced rat liver fibrogenesis

E.I. Lebedeva¹, A.S. Babenka², A.T. Shchastniy¹

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

²Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2022;21(3):17-26.

Резюме.

Цель работы – получить максимально подробные данные о динамике уровня мРНК генов сигнального пути Tweak/Fn14 на морфологически подтвержденных стадиях фиброгенеза печени с использованием полуколичественной шкалы Ishak K.G.

Материал и методы. Фиброгенез печени у крыс Wistar индуцировали тиоацетамидом в дозе 200 мг/кг веса животного два раза в неделю в течение 17 недель. Методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени изучали уровень мРНК генов *tweak*, *fn14* сигнального пути Tweak/Fn14. Для получения обзорных препаратов срезы печени окрашивали гематоксилином и эозином, а для выявления соединительной ткани – методом Маллори. Степень фиброза оценивали с использованием полуколичественной шкалы Ishak K.G.

Результаты. По истечении трех недель эксперимента (степень фиброза по шкале Ishak K.G. соответствовала F1) отметили рост мРНК гена *fn14* в 5 раз ($p=0,029$) и падение мРНК гена *tweak* в 2 раза ($p=0,001$) по сравнению с контрольной точкой. На терминальных стадиях фиброгенеза (степень фиброза F4/F5, переход фиброза в цирроз) установили максимальный рост уровня мРНК гена *fn14* в 8 раз ($p=0,001$), но при этом на стадии цирроза (F5-F6) наблюдали минимальный уровень мРНК гена *tweak* (падение в 20 раз, $p=0,001$) по сравнению с контрольной точкой. Заключение. При морфологически верифицированной трансформации фиброза печени в цирроз (точка m4, 9 недель эксперимента) на фоне максимальной экспрессии мРНК гена *fn14* установлена индукция экспрессии мРНК гена *tweak*. Подробное изучение точки перехода фиброза в цирроз требует дополнительного внимания и последующего изучения. Возможно, именно эта точка поможет раскрыть новые подробности о роли сигнального пути Tweak/Fn14 в процессе индуцированного химическими факторами фиброгенеза. В связи с этим требуются дополнительные исследования, направленные на получение еще более подробной информации с привязкой ассоциированных микроРНК, длинных не кодирующих РНК и пр. регуляторных элементов; эпигенетических и метаболомных параметров.

Ключевые слова: крысы Wistar; фиброгенез печени, сигнальный путь Tweak/Fn14, полуколичественная шкала Ishak K.G., уровень мРНК, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

Abstract.

Objectives. To obtain the most detailed data on the dynamics of the mRNA level of the Tweak/Fn14 signaling pathway genes at morphologically confirmed stages of liver fibrogenesis using the Ishak K.G. semi-quantitative scale.

Material and methods. Liver fibrogenesis in Wistar rats was induced with thioacetamide at a dose of 200 mg/kg animal weight twice a week during 17 weeks. Real-time PCR was used to study the level of mRNA of the *tweak* and *fn14* genes. Liver sections were stained with hematoxylin and eosin, as well as by the Mallory method. Fibrosis stage was assessed using the Ishak K.G. semi-quantitative scale.

Results. After three weeks of the experiment (the degree of fibrosis according to the Ishak K.G. scale corresponded to F1), a 5 times ($p=0.029$) increase in mRNA of the *fn14* gene and a 2 times ($p=0.001$) decrease in mRNA of the *tweak* gene were observed compared with the control point.

At the terminal stages of fibrogenesis (the degree of fibrosis F4/F5, the transition of fibrosis to cirrhosis), there was a maximum increase in the level of mRNA of the *fn14* gene – about 8 times ($p=0.001$) compared with the control point. At the same time, at the stage of cirrhosis (F5-F6), the minimum level of mRNA of the *tweak* gene was observed (20-fold drop, $p=0.001$) compared to the control point.

Conclusions. On the 9th week of the experiment, the transition of fibrosis to cirrhosis was morphologically proved. At this stage, the maximum mRNA level of the *fn14* gene was observed, as well as the induction of the *tweak* mRNA level. A detailed study of the transition point of fibrosis to cirrhosis requires additional attention and further study. Perhaps this point will help reveal new details about the role of the *Tweak/Fn14* signaling pathway in the process of chemically induced fibrogenesis. Additional studies are required to obtain even more detailed information, taking into account miRNAs, long non-coding RNAs, and other regulatory elements; epigenetic and metagenomic parameters.

Keywords: *Wistar rats, liver fibrogenesis, Tweak/Fn14 signaling pathway, Ishak K.G. semi-quantitative scale, mRNA level, real-time PCR.*

Введение

Прогрессирующий фиброз печени приводит к возникновению цирроза, печеночной недостаточности, гепатоцеллюлярной карциноме и представляет собой одну из серьезных проблем в области здравоохранения [1-3]. В настоящее время молекулярные механизмы инициации и развития фиброгенеза не определены [4-6]. Тем не менее накопленные данные позволяют сделать выводы о вовлечении в этот процесс ряда сигнальных путей, например, таких как *Tweak/Fn14*. Особенность данного пути – это строго регламентированный характер его проявления, примером которого являются конкретные типы клеток, экспрессирующие лиганд и рецептор, и модуляция уровней их экспрессии в ответ на внешние раздражители [7-9].

Ключевыми элементами сигнального пути *Tweak/Fn14* являются: ген *tnfsf12* (*tweak*), кодирующий белок цитокин, который принадлежит к семейству факторов некроза опухоли (TNF), и ген *tnfrsf12* (*fn14/tweakr*), кодирующий соответствующий рецептор для связывания с *tweak*. В клетках человека обнаружено несколько альтернативных сплайс-вариантов мРНК гена *tweak*. Интересно то, что некоторые транскрипты пропускают последний экзон гена и продолжают во втором экзоне расположенного рядом гена *tnfsf13* [8, 9]. Белок-лиганд *tweak* отвечает

за активацию тех же путей, что и собственно фактор некроза опухолей, но в отличие от него куда более распространен в тканях. Он может встречаться как в свободной, так и в связанной с мембраной форме. В качестве цитокина, белок *tweak* контролирует процесс апоптоза, участвует в регуляции пролиферации и миграции клеток эндотелия сосудов, тем самым выступая ангиогенным фактором, способен стимулировать выработку провоспалительных цитокинов, включая IL8 (интерлейкин 8) [7].

Под воздействием каких-либо факторов, способных вызвать поражения печени исследователями отмечено повышение уровня экспрессии гена *fn14* (рецептора *tweak*). В то же время экспрессия самого лиганда *tweak* регистрируется преимущественно в макрофагах и натуральных киллерах. Показано, что взаимодействие лиганда *tweak* и рецептора *fn14* регулирует развитие фиброза в таких органах, как сердце, почки, кишечник, печень, мышцы, а также патогенез онкологических и аутоиммунных заболеваний [7-15].

Несмотря на то, что достигнут значительный прогресс в познании работы сигнального пути *Tweak/Fn14* при фиброгенезе органов еще многое предстоит изучить. Ученые сообщают о необходимости исследования роли комплекса *Tweak/Fn14* в зависимости от стадий заболевания. Понимание молекулярных процессов, приводящих к фиброзу органов, будет иметь решающее значе-

ние для разработки новых терапевтических стратегий [8-10].

Анализ литературных источников (PubMed, SpringerLink, Google Scholar и др.) показал, что за последние несколько лет ни одно исследование, посвященное изучению индуцированного фиброгенеза печени на экспериментальной модели, не смогло в полном объеме отразить изменения уровня мРНК генов сигнального пути Tweak/Fn14, что затрудняет выяснение роли этого пути. Полученные исследователями данные затрагивают ключевые этапы фиброгенеза, тем не менее значительная часть информации о процессе по тем или иным причинам теряется.

В связи с вышеизложенным целью настоящего исследования – получить максимально подробные данные о динамике уровня мРНК генов сигнального пути Tweak/Fn14 на морфологически подтвержденных стадиях фиброгенеза печени с использованием полуколичественной шкалы Ishak K.G.

Материал и методы

Эксперимент на животных

В эксперименте использовали 117 половозрелых крыс-самцов Wistar весом от 190-210 г. Фиброз и цирроз печени у животных индуцировали раствором тиаоацетамида (ТАА), который вводили в желудок с помощью зонда в дозе 200 мг/кг массы тела животного 2 раза в нед в течение 17 нед. С использованием генератора случайных чисел животных рандомизировали на 9 групп по 12 особей в каждой (m0 – контрольная, m1 – длительность воздействия ТАА 3 нед, m2 – длительность воздействия ТАА 5 нед, m3 – длительность воздействия ТАА 7 нед, m4 – длительность воздействия ТАА 9 нед, m5 – длительность воздействия ТАА 11 нед, m6 – длительность воздействия ТАА 13 нед, m7 – длительность воздействия ТАА 15 нед, m8 – длительность воздействия ТАА 17 нед). Для исследования уровня экспрессии мРНК генов сигнального пути TWEAK/Fn14 в динамике опытных крыс выводили из эксперимента через 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 и 17 нед, а интактных – по окончании эксперимента. В ходе эксперимента погибло 9 животных.

Протокол исследования был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными при учреждении образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский универси-

тет» (протокол № 6 от 03.01.2019). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с рекомендациями Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях от 18.03.1986, Директиве Совета ЕЭС от 24.11.1986 и рекомендациям FELASA Working Group Report (1994-1996).

Пробоподготовка

Животных выводили из эксперимента согласно разделению по группам (точки m0-m8). Немедленно после декапитации из большой левой доли печени крыс скальпелем забирали фрагменты органа диаметром не более 5 мм. Работа проводилась при температуре +20°C с жестким соблюдением временных интервалов – манипуляции с одним животным 100-140 секунд. После забора образцы помещали в криопробирки и далее в жидкий азот для транспортировки и хранения непосредственно до начала процедуры выделения суммарной РНК. Гомогенизацию отобранного материала осуществляли с использованием фарфоровых ступок и пестиков в присутствии жидкого азота, не допуская размораживания ткани.

Выделение суммарной РНК

Выделение суммарной РНК из исследуемых образцов печени проводили с помощью набора реагентов «АртРНК MiniSpin» (ООО «АртБиоТех», Беларусь) согласно протоколу производителя. После процедуры выделения и очистки суммарную РНК элюировали с мини-колонок с помощью свободной от РНКаз milliQ воды, входящей в состав набора. Контроль качественных характеристик образцов выполняли с помощью электрофореза в агарозном геле (выборочно) без денатурирующих условий (1x TAE, 2% гель). Количество суммарной РНК после выделения определяли с помощью спектрофотометрии (длина волны 260 нм, Specord 250 (Analytic Jena, Германия)). Выборочно снимали спектр поглощения 220-340 нм.

Обратная транскрипция

Синтез кДНК проводили с использованием олиго дТ праймеров и набора реагентов ArtMMLV Total (ООО «АртБиоТех», Беларусь) в соответствии с инструкцией производителя. Для одной реакции применяли одинаковое стартовое количество суммарной РНК 200 нг/реакцию.

Дизайн специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов

Для дизайна использовали данные о последовательностях мРНК генов депонированных в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). В качестве молекулярных мишеней для оценки уровня мРНК генов сигнального пути Tweak/Fn14 выбрали: fn14 и tweak; в качестве кандидатов в референсные гены: sdha, hprt1 и hes1. Подробная информация о генах-мишенях и референсных генах представлена в таблице 1.

В случае наличия нескольких вариантов мРНК перед началом дизайна проводили их выравнивание с помощью бесплатного программного пакета Ugene v.33 (UniPro, Россия). Для дизайна использовали консервативные участки последовательности мРНК (позволяющие анализировать все известные альтернативные сплайс формы мРНК суммарно) с соблюдением правила о размещении одного или более олигонуклеотидов в месте соединения двух разных экзонов. Первичный дизайн осуществляли с помощью бесплатного онлайн-приложения Primer3 v. 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Уникальность и специфичность полученных олигонуклеотидов проверяли с помощью онлайн сервиса Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Анализ наличия стабильных

димеров и шпилечных структур олигонуклеотидов и ампликонов, а также моделирование оптимальных условий ПЦР-РВ проводили с помощью бесплатного онлайн-программного пакета mFold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>) и бесплатного онлайн-приложения OligoAnalyser (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Последовательности олигонуклеотидов представлены в таблице 2.

Оценка уровня мРНК генов-мишеней методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ)

При выполнении метода ПЦР-РВ использовали реагенты производства ОДО «Праймтех», Беларусь. Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл и содержал все необходимые компоненты в следующих концентрациях и количествах: 2 мМ хлорида магния, 0,1 мМ смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов, 500 нМ олигонуклеотидов, включая зонд для ПЦР-РВ, 1,25 ед. термостабильной Taq ДНК-полимеразы с соответствующим буферным раствором. Режим термоциклирования: +95°C – 2 мин, затем 40 циклов: +95°C – 5 сек, +60°C – 45 сек. Детекция по каналу FAM после каждого цикла. В работе использовали оборудование производства

Таблица 1 – Характеристика генов-мишеней и кандидатов в референсные гены

Название гена	Статус	NCBI Gene ID	Референсная последовательность мРНК	Кодируемый белок
Tnfrsf12a (fn14)	мишень	302965	NM_181086.3	член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей 12A, TNF receptor superfamily member 12A
Tnfsf12 (tweak)	мишень	360548	NM_001001513.2	член суперсемейства фактора некроза опухоли 12, TNF superfamily member 12
Hprt1	кандидат в референсные гены	24465	NM_012583.2	гипоксантин фосфорибозил трансфераза, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
Sdha	кандидат в референсные гены	157074	NM_130428.1	субъединица А флавопротеина, входящего в комплекс сукцинат дегидрогеназы, succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A
Hes1*	кандидат в референсные гены	29577	NM_024360.4	фактор транскрипции 1 семейства bHLH (basic helix-loop-helix), hes family bHLH transcription factor 1

Примечание: * – ген hes1 использован в качестве кандидата в референсные гены, поскольку в предварительных экспериментах показал высокий уровень стабильности экспрессии, первоначально рассматривался как ген-мишень.

Таблица 2 – Последовательности специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов

Ген	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	
fn14	Прямой Обратный Зонд	GGATGCGCAGCAGCAC CAAAACCAGGGCCAGACTAA FAM-CCTGCCCACTTCAGGATGCT-BHQ1
tweak	Прямой Обратный Зонд	CCCATTATGAGGTTTCATCCAC TCTCTTCCCAGCCACTCACT FAM-GACAGGATGGAGCACAGGCA-BHQ1
hprt1	Прямой Обратный Зонд	GGACAGGACTGAAAGACTTGCT ACAGAGGGCCACAATGTGAT FAM-CATGAAGGAGATGGGAGGCC-BHQ1
sdha	Прямой Обратный Зонд	CCCACAGGTATCTATGGTGCT TTGGCTGTTGATGAGAATGC FAM-CATCACAGAAGGGTGCCGTG-BHQ1
hes1	Прямой Обратный Зонд	GAAAGATAGCTCCCGGCATT CGGAGGTGCTTCACTGTCAT FAM-CCAAGCTGGAGAAGGCAGACA-BHQ1

компании BioRad (прибор CFX96touch, США). Критерием успешной оптимизации считали наименьший показатель цикла амплификации. Эффективность реакций определяли с помощью метода стандартной кривой и серий разведений, концентрированных образцов кДНК. Шаг 5 раз. Критерием удовлетворительной эффективности считали не менее 95%. Все реакции проводили в триплетах. В каждой экспериментальной и контрольной группах все 12 образцов анализировали отдельно для получения наибольшей достоверности и учета внутригрупповой вариации, фенотипической гетерогенности уровня экспрессии генов. Процентное соотношение генов-мишеней в разных контрольных точках (m0-m8) определяли на основании относительного уровня экспрессии и данных стандартной кривой (процентное отношение значений Cq).

В качестве референсного гена для нормализации данных ПЦР-РВ использовали *hes1*, характеризующийся наименьшим разбросом значений во всех контрольных точках. Уровень мРНК этого гена в предварительном исследовании (данные не приводятся) не показал ответа на экспериментальное воздействие в течение всего периода наблюдений (17 нед.), а вариация уровня его мРНК внутри одного эксперимента от животного к животному варьировала в пределах 1 цикла. Использование *sdha* и *hprt1*, а также их комбинации не повышало точность оценки и не вносило принципиальных изменений в конечные расчеты.

Морфологические методы исследования

При выполнении гистологического исследования образцы печени фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина на фосфатном буфере в течение 24 часов. Обработку фиксированного материала, заливку ткани парафином, изготовление срезов толщиной 4 мкм и окраску осуществляли по общепринятой методике. В работе использовали следующее оборудование: автомат для гистологической обработки ткани (STP-120, тип карусель, Thermo Fisher Scientific, Германия); станцию для заливки ткани парафином (EC350, Thermo Fisher Scientific, Германия); ротационный микротом (HM340E, MICROM, Laborgerate GmbH, Германия); автоматический программируемый прибор для цитологических и гистологических исследований (HMS70, Thermo Fisher Scientific, Германия). Срезы печени окрашивали гематоксилином и эозином, а также методом Маллори. Гистологические препараты изучали с использованием микроскопа OLYMPUS BX51 (Япония) при увеличении объективов 10×, 20×, 40× и компьютерных программ ImageScope Color и cellSens Standard. Степень фиброза оценивали с использованием полуколичественной шкалы Ishak K.G. [16].

Статистические методы анализа

Результаты количественных измерений оценивали с использованием программ Statistica 10.0 фирмы StatSoft, IBM SPSS Statistics 23.0,

Microsoft Office Excel. В выборках по каждой нед эксперимента определяли нормальность частотного распределения признака по критерию Шапиро-Уилка. О достоверности различий изучаемых признаков с нормальным частотным распределением судили по t-критерию Стьюдента. При отличии частотного распределения признака от нормального использовали U-критерий Манна-Уитни. Изучение значимости влияния нед эксперимента (стадии фиброза/цирроза) на исследуемые признаки проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа.

Результаты и обсуждение

Фиброз печени регулируется сложной сетью молекулярных сигналов, которые до сих пор исследуются и идентифицируются. В последнее десятилетие в ряде экспериментальных работ сообщалось о роли сигнального пути Tweak/Fn14 в развитии фиброза печени. Однако его вклад в данный процесс еще далек от понимания [7-9, 15].

При оценке результатов метода ПЦР-РВ в группе контрольных животных (точка m0) уровень мРНК генов fn14 и tweak был принят за единицу. На рисунке 1 представлена динамика уровня мРНК гена fn14 на протяжении всего эксперимента (точки m0-m8). Морфологический анализ печени интактных крыс соответствовал критериям нормы. Степень фиброза по шкале Ishak K.G. была равной F0.

По истечении трех нед эксперимента (точка m1) на фоне выявленного фиброза печени (его степень по шкале Ishak K.G. соответствовала F1) наблюдали рост мРНК гена fn14 в 5 раз ($p=0,029$) по сравнению с контрольной точкой m0. Похожее поведение этого параметра отмечалось в ряде работ, посвященных изучению фиброгенеза [9, 12, 17]. По-видимому, это связано с нарастанием воспаления в поврежденной паренхиме печени. Согласно литературным данным, в условиях физиологической нормы уровень fn14 остается достаточно низким [7].

На терминальных стадиях фиброгенеза, в точке m4 (степень фиброза по шкале Ishak K.G. соответствовала F4/F5, переход фиброза в цирроз) выявили максимальный рост уровня мРНК гена fn14 в 8 раз ($p=0,001$) по сравнению с точкой m0. В этой же точке установили максимальный разброс значений от животного к животному. Интересно отметить, что в дальнейшем при переходе фиброза в цирроз (точки m5-m8) уровень fn14 заметно снизился, однако не достигал значений контрольной точки m0 и не были статистически значимы ($p>0,05$).

Следует обратить особое внимание на тот факт, что в абсолютном большинстве работ отечественных и зарубежных авторов исследователи используют недостаточное количество исследуемых точек при моделировании фиброза [7, 8, 18]. На рисунке 1 представлены данные по 9 точкам. Точки m0 и m4-m5, а также m6, точнее стадии

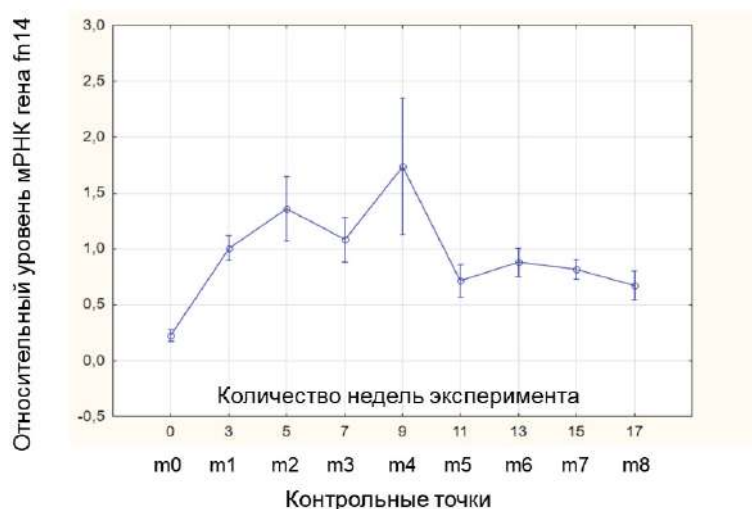


Рисунок 1 – Изменение уровня мРНК гена fn14 в ходе моделирования фиброза в печени крыс.

Уровень мРНК представлен безразмерными единицами – нормализованные данные относительно референсного гена hes1. Для каждой контрольной точки представлены доверительные интервалы значений

фиброза, фигурируют в подобных работах. Однако видно, что более детальное рассмотрение как минимум точек m4 и m5 просто необходимо для правильного понимания процесса перехода фиброза в цирроз. Наряду с этим точки m1-m3 также требуют дополнительного внимания в особенности потому, что здесь важно отследить индивидуальную реакцию модельных животных на индуцирующий фактор. Разброс значений уровня мРНК гена fn14 дает отчетливо понять, что животные проходят стадии фиброза асинхронно ввиду индивидуальных различий внутри группы.

В отличие от гена fn14, уровень мРНК его лиганда (tweak) статистически значимо понизился. На рисунке 2 представлена динамика уровня мРНК гена tweak на протяжении всего эксперимента (точки m0-m8).

Максимальный разброс значений от животного к животному установлен в контрольной точке (m0). Согласно литературным данным белок-лиганд tweak отвечает за активацию тех же путей, что и фактор некроза опухолей, но в отличие от него куда более распространен в тканях. В норме он может встречаться как в свободной, так и в связанной с мембраной форме. В качестве цитокина, белок tweak контролирует процесс апоптоза, участвует в регуляции пролиферации и миграции клеток эндотелия сосудов, способен стимулировать выработку провоспалительных цитокинов [7, 13]. Возможно, большой разброс значений в точке m0 связан с описанными выше фактами.

Падение уровня мРНК гена tweak в точке m1 не превышало 2 раз, однако являлось статистически значимым по сравнению с контрольной точкой m0 ($p=0,001$). Вероятно, это изменение не было критичным в количественном плане и позволяло комплексу Tweak/Fn14 выполнять свою роль в процессах фиброгенеза. Известно, что комплекс Tweak/Fn14 стимулирует выработку коллагена и его разрушение за счет активации ММР (матриксные металлопротеиназы) и ТИМР (ингибиторы металлопротеиназ), но в целом оказывает эффект накопления соединительной ткани в органах [7]. С другой стороны, он активирует пролиферацию и дифференцировку клеток-предшественников что выражается в синтезе, накоплении соединительной ткани и прогрессировании фиброза. Также показано, что комплекс Tweak/Fn14 способен ингибировать дифференцировку клеток-предшественников [8, 10]. Каким образом связывание tweak с рецептором fn14 запускает противоречивые реакции еще предстоит изучить.

В точке m4 (степень фиброза по шкале Ishak K.G. соответствовала F4/F5, переход фиброза в цирроз) как и в случае с уровнем мРНК гена fn14, наблюдали относительный рост уровня мРНК гена tweak по сравнению с m2 и m3 (F2-F4, фиброгенез). Вероятно, переход фиброза в цирроз сопровождается активацией механизмов, регулируемых Tweak/Fn14 даже несмотря на угнетение экспрессии гена tweak в ходе фиброгенеза. Интересно, что на стадии цирроза (F5-F6) в точках m5-m8 отме-

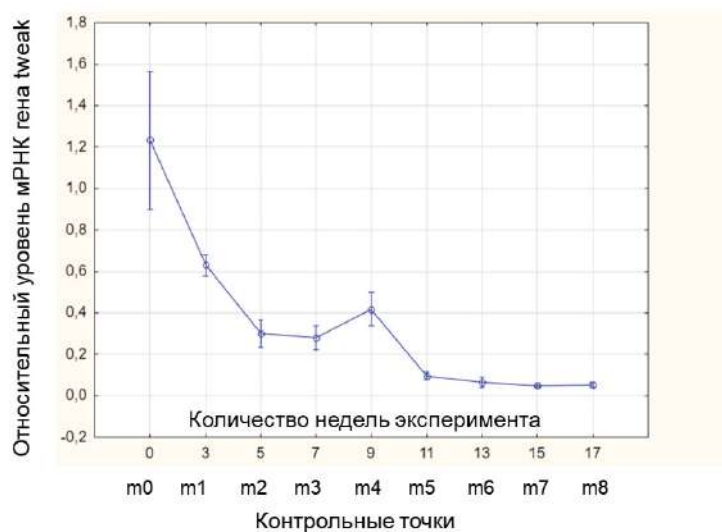


Рисунок 2 – Изменение уровня мРНК гена tweak в ходе моделирования фиброза в печени крыс.

Уровень мРНК представлен безразмерными единицами – нормализованные данные относительно референсного гена hes1. Для каждой контрольной точки представлены доверительные интервалы значений

чали минимальный уровень мРНК гена *tweak* по сравнению как с контрольной точкой *m0*, так и по сравнению с точкой *m4*. Максимальное падение уровня мРНК гена *tweak* достигла 20 раз ($p=0,001$) по сравнению как с контрольной точкой.

В норме уровень мРНК *tweak* в печени взрослых крыс является одним из самых низких по отношению к другим органам и в разы уступает уровню в легких и сердце. Аналогичная картина характерна и для рецептора *fn14*, причем их относительное процентное отношение в норме описано как примерно одинаковое или отличающееся не более чем в 2-3 раза с преобладанием *tweak* [19]. В работе [17] показано, что в ходе фиброза как *tweak*, так и его рецептор *fn14* активируются и их уровень возрастает. Однако в рамках нашей работы мы зафиксировали лишь рост уровня *fn14* при статистически значимом снижении уровня *tweak*. Вероятно, количество активных комплексов *Tweak/Fn14* при этом поддерживалось на необходимом уровне для реализации всех ассоциированных процессов.

Мы оценили относительное процентное соотношение мРНК генов-мишеней. Данные представлены в таблице 3.

Как видно из нее, в ходе эксперимента уровень мРНК гена *fn14* непрерывно увеличивал процентное отношение с уровнем мРНК гена *tweak*. Является ли это следствием попытки компенсировать нехватку активных комплексов *Tweak/Fn14* или, наоборот, не связано с этим процессом, а является следствием вовлечения гена *fn14* в иные процессы, остается невыясненным и требует дальнейшего изучения.

Заключение

Подробный анализ изменений уровня мРНК генов *tweak* и *fn14* позволил выявить, что внутри-

групповая вариация этих параметров у экспериментальных животных на разных стадиях фиброза является недооцененным фактором и требует дальнейшего изучения. Установлено, что уровень мРНК гена *tweak* характеризуется низкой внутригрупповой вариацией на всех стадиях фиброза, однако в условиях нормы наблюдается высокая степень гетерогенности этого параметра. Напротив, уровень мРНК гена *fn14* показывает минимальную вариацию внутри группы в норме.

В некоторых работах отмечается рост *tweak* и *fn14* при фиброгенезе. Часто это оценивается на уровне белка. В нашем случае мы изучали только уровень мРНК генов. Принимая во внимание широкий спектр функций, которые выполняют *tweak* и *fn14* в клетке, можно предположить, что в ответ на индукцию фиброза лишь часть активных комплексов *Tweak/Fn14* идут на обеспечение самого процесса. Рост *fn14* на фоне падения *tweak* может быть объяснен и попыткой системы компенсировать нехватку активных комплексов *Tweak/Fn14* из-за снижения уровня мРНК *tweak*.

При морфологически верифицированной трансформации фиброза печени в цирроз (точка *m4*, 9 недель эксперимента) на фоне максимального уровня мРНК гена *fn14* установлена индукция уровня мРНК *tweak*. Мы считаем, что подробное изучение точки перехода фиброза в цирроз требует дополнительного внимания и последующего изучения. Возможно, именно эта точка поможет раскрыть новые подробности о роли сигнального пути *Tweak/Fn14* в процессе индуцированного химическими факторами фиброгенеза.

Касательно полученных нами результатов о статистически значимом снижении уровня мРНК гена *tweak* стоит отметить, что на данный показатель влияет большое количество факторов, контроль за которыми в настоящее время затруднен

Таблица 3 – Относительное содержание мРНК *tweak* и *fn14* в процентах

Контрольная точка	Уровень мРНК <i>tweak</i> , %	Уровень мРНК <i>fn14</i> , %	Соотношение <i>tweak/fn14</i> (окр)
<i>m0</i>	82,6	17,4	5:1
<i>m1</i>	38,1	61,9	1:1,6
<i>m2</i>	15,8	84,2	1:5
<i>m3</i>	18,5	81,5	1:4
<i>m4</i>	23,2	76,8	1:3
<i>m5</i>	14,3	85,7	1:6
<i>m6</i>	5,9	94,1	1:16
<i>m7</i>	5,3	94,7	1:17
<i>m8</i>	6,1	93,9	1:15

или вовсе невозможен внутри живой модельной системы. Мы предполагаем, что на результаты настоящего исследования, а также аналогичных работ может влиять: конкретный тип повреждающего печеный агента, микроокружение, температура, влажность, возраст и пол модельных животных, а также наличие неописанных пока альтернативных сплайс-форм мРНК генов-мишеней.

В связи с этим требуются дополнительные исследования, направленные на получение еще более подробной информации с привязкой ассоциированных микроРНК, длинных не кодирующих РНК и пр. регуляторных элементов; эпигенетических и метагеномных параметров.

Источник финансирования: Работа выполнена в рамках проекта задания государственной программы научных исследований «Изучить роль экспрессии генов NOTCH- и TWEAK-сигнальных путей, участвующих в процессах пролиферации и дифференцировки клеток печени в норме и при ее токсическом поражении» (номер государственной регистрации 20190107).

Funding: The research was conducted within the frames of the theme task of the State Research Programs (GPNI) of the Republic of Belarus «To study the role of expression of the NOTCH- and TWEAK signaling pathways genes, participating in the processes of proliferation and differentiation of liver cells in the norm and in case of its toxic damage» (№ GR 20190107).

Литература

1. The burden of liver cirrhosis and underlying etiologies: results from the global burden of disease study 2017 / M. Zhai [et al.] // Aging (Albany NY). 2021 Jan. Vol. 13, N 1. P. 279–300. doi: 10.18632/aging.104127
2. Burden of liver diseases in the world / S. K. Asrani [et al.] // J. Hepatol. 2019 Jan. Vol. 70, N 1. P. 151–171. doi: 10.1016/j.jhep.2018.09.014
3. Cirrhotic portal hypertension: From pathophysiology to novel therapeutic / L. S. Gunaratne [et al.] // World J. Gastroenterol. 2020 Oct. Vol. 26, N 40. P. 6111–6140. doi: 10.3748/wjg.v26.i40.6111
4. George, J. Molecular mechanisms in the pathogenesis of N-nitrosodimethylamine induced hepatic fibrosis / J. George, M. Tsuchishima, M. Tsutsumi // Cell. Death Dis. 2019 Jan. Vol. 10, N 1. P. 18. doi: 10.1038/s41419-018-1272-8
5. Roehlen, N. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives / N. Roehlen, E. Crouch, T. F. Baumert // Cells. 2020 Apr. Vol. 9, N 4. P. 875. doi: 10.3390/cells9040875
6. Tadokoro, T. Diagnosis and Therapeutic Management of Liver Fibrosis by MicroRNA / T. Tadokoro, A. Morishita, T. Masaki // Int. J. Mol. Sci. 2021 Jul. Vol. 22, N 15. 8139. doi: 10.3390/ijms22158139
7. Zhang, Y. TWEAK/Fn14 axis is an important player in fibrosis / Y. Zhang, W. Zeng, Y. Xia // J. Cell. Physiol. 2021 May. Vol. 236, N 4. P. 3304–3316. doi: 10.1002/jcp.30089
8. Interaction of TWEAK with Fn14 leads to the progression of fibrotic liver disease by directly modulating hepatic stellate cell proliferation / A. Wilhelm [et al.] // J. Pathol. 2016 May. Vol. 239, N 1. P. 109–121. doi: 10.1002/path.4707
9. TWEAK and LTβ Signaling during Chronic Liver Disease / B. J. Dwyer [et al.] // Front Immunol. 2014 Feb. Vol. 5. P. 39. doi: 10.3389/fimmu.2014.00039
10. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis is a mitogen for liver progenitor cells / J. E. E. Tirnitz-Parker [et al.] // Hepatology. 2010 Jul. Vol. 52, N 1. P. 291–302. doi: 10.1002/hep.23663
11. Blanco-Colio, L. M. TWEAK/Fn14 Axis: A Promising Target for the Treatment of Cardiovascular Diseases / L. M. Blanco-Colio // Front Immunol. 2014 Jan. Vol. 5. P. 3. doi: 10.3389/fimmu.2014.00003
12. Wang, X. Tumor Necrosis Factor Receptor Mediates Fibroblast Growth Factor-Inducible 14 Signaling / X. Wang, S. Xiao, Y. Xia // Cell. Physiol. Biochem. 2017 Sep. Vol. 43, N 2. P. 579–588. doi: 10.1159/000480530
13. Wajant, H. The TWEAK-Fn14 system as a potential drug target / H. Wajant // Br. J. Pharmacol. 013 Oct. Vol. 170, N 4. P. 748–764. doi: 10.1111/bph.12337
14. Evaluation of Computationally Designed Peptides against TWEAK, a Cytokine of the Tumour Necrosis Factor Ligand Family / M. Badia-Villanueva [et al.] // Int. J. Mol. Sci. 2021 Jan. Vol. 22, N 3. 1066. doi: 10.3390/ijms22031066
15. TWEAK/Fn14 signalling promotes cholangiocarcinoma niche formation and progression // B. J. Dwyer [et al.] // J. Hepatol. 2021 Apr. Vol. 74, N 4. P. 860–872. doi: 10.1016/j.jhep.2020.11.018
16. Prognostic value of Ishak fibrosis stage: findings from the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial / J. E. Everhart [et al.] // Hepatology. 2010 Feb. Vol. 51, N 2. P. 585–594. doi: 10.1002/hep.23315
17. TWEAK-Fn14 Signaling Activates Myofibroblasts to Drive Progression of Fibrotic Kidney Disease / I. G. Gomez [et al.] // J Am Soc Nephrol. 2016 Dec. Vol. 27, N 12. P. 3639–3652. doi: 10.1681/ASN.2015111227
18. Регуляция пролиферации гепатоцитов после субтотальной резекции печени крыс / А. В. Ельчанинов [и др.] // Гены и клетки. 2018. Т. 13, № 4. С. 37–42. doi: 10.23868/201812045
19. A rat RNA-Seq transcriptomic BodyMap across 11 organs and 4 developmental stages / Y. Yu [et al.] // Nat. Commun. 2014. Vol. 5. – 3230. doi: 10.1038/ncomms4230

Поступила 29.03.2022 г.

Принята в печать 08.06.2022 г.

References

- Zhai M, Long J, Liu S, Liu C, Li L, Yang L, et al. The burden of liver cirrhosis and underlying etiologies: results from the global burden of disease study 2017. *Aging* (Albany NY). 2021 Jan;13(1):279-300. doi: 10.18632/aging.104127
- Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the World J Hepatol. 2019 Jan;70(1):151-71. doi: 10.1016/j.jhep.2018.09.014
- Gunarathne LS, Rajapaksha H, Shackel N, Angus PW, Herath CB. Cirrhotic portal hypertension: From pathophysiology to novel therapeutic. *World J Gastroenterol*. 2020 Oct;26(40):6111-40. doi: 10.3748/wjg.v26.i40.6111
- George J, Tsuchishima M, Tsutsumi M. Molecular mechanisms in the pathogenesis of N-nitrosodimethylamine induced hepatic fibrosis. *Cell Death Dis*. 2019 Jan;10(1):18. doi: 10.1038/s41419-018-1272-8
- Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives. *Cells*. 2020 Apr;9(4):875. doi: 10.3390/cells9040875
- Tadokoro T, Morishita A, Masaki T. Diagnosis and Therapeutic Management of Liver Fibrosis by MicroRNA. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul;22(15):8139. doi: 10.3390/ijms22158139
- Zhang Y, Zeng W, Xia Y. TWEAK/Fn14 axis is an important player in fibrosis. *J Cell Physiol*. 2021 May;236(5):3304-16. doi: 10.1002/jcp.30089.
- Wilhelm A, Shepherd EL, Amatucci A, Munir M, Reynolds G, Humphreys E, et al. Interaction of TWEAK with Fn14 leads to the progression of fibrotic liver disease by directly modulating hepatic stellate cell proliferation. *J Pathol*. 2016 May;239(1):109-21. doi: 10.1002/path.4707
- Dwyer BJ, Olynyk JK, Ramm GA, Timnitz-Parker JE. TWEAK and LTB β Signaling during Chronic Liver Disease. *Front Immunol*. 2014 Feb;5:39. doi: 10.3389/fimmu.2014.00039
- Timnitz-Parker JEE, Viebahn CS, Jakubowski A, Klopce BRS, Olynyk JK, Yeoh GCT, et al. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis is a mitogen for liver progenitor cells. *Hepatology*. 2010 Jul;52(1):291-302. doi: 10.1002/hep.23663
- Blanco-Colio LM. TWEAK/Fn14 Axis: A Promising Target for the Treatment of Cardiovascular Diseases. *Front Immunol*. 2014 Jan;5:3. doi: 10.3389/fimmu.2014.00003
- Wang X, Xiao S, Xia Y. Tumor Necrosis Factor Receptor Mediates Fibroblast Growth Factor-Inducible 14 Signaling. *Cell Physiol Biochem*. 2017 Sep;43(2):579-88. doi: 10.1159/000480530
- Wajant H. The TWEAK-Fn14 system as a potential drug target. *Br J Pharmacol*. 2013 Oct;170(4):748-64. doi: 10.1111/bph.12337
- Badia-Villanueva M, Defaus S, Foj R, Andreu D, Oliva B, Sierra A, et al. Evaluation of Computationally Designed Peptides against TWEAK, a Cytokine of the Tumour Necrosis Factor Ligand Family. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan;22(3):1066. doi: 10.3390/ijms22031066
- Dwyer BJ, Jarman EJ, Gogoi-Tiwari J, Ferreira-Gonzalez S, Boulter L, Guest RV, et al. TWEAK/Fn14 signalling promotes cholangiocarcinoma niche formation and progression. *J Hepatol*. 2021 Apr;74(4):860-72. doi: 10.1016/j.jhep.2020.11.018. Epub 2020 Nov 19
- Everhart JE, Wright EC, Goodman ZD, Dienstag JL, Hoefs JC, Kleiner DE, et al. Prognostic value of Ishak fibrosis stage: findings from the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial. *Hepatology*. 2010 Feb;51(2):585-94. doi: 10.1002/hep.23315
- Gomez IG, Roach AM, Nakagawa N, Amatucci A, Johnson BG, Dunn K, et al. TWEAK-Fn14 Signaling Activates Myofibroblasts to Drive Progression of Fibrotic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2016 Dec;27(12):3639-52. doi: 10.1681/ASN.2015111227
- Elchaninov AV, Makarov AV, Vorobeva IG, Kananykhina EI, Lokhonina AV, Glinkina VV, et al. Regulation of hepatocyte proliferation after subtotal liver resection in rats. *Geny Kletki*. 2018;13(4):37-42. (In Russ.) doi: 10.23868/201812045
- Yu Y, Fuscoe JC, Zhao C, Guo C, Jia M, Qing T, et al. A rat RNA-Seq transcriptomic BodyMap across 11 organs and 4 developmental stages. *Nat Commun*. 2014 Feb;5:3230. doi: 10.1038/ncomms4230

Submitted 29.03.2022

Accepted 08.06.2022

Сведения об авторах:

Е.И. Лебедева – к.б.н., доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, Витебский государственный орден Дружбы народов медицинский университет, <https://orcid.org/0000-0003-1309-4248>

E-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru – Лебедева Елена Ивановна

А.С. Бабенко – к.х.н., доцент кафедры биоорганической химии, Белорусский государственный медицинский университет, <https://orcid.org/0000-0002-5513-970X>

А.Т. Щастный – д.м.н., профессор, ректор, зав. кафедрой госпитальной хирургии с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный орден Дружбы народов медицинский университет, <https://orcid.org/0000-0003-2796-4240>

Information about authors:

E.I. Lebedeva. – Candidate of Biological Sciences associate professor of the Chair of Histology, Cytology and Embryology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, <https://orcid.org/0000-0003-1309-4248>

E-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru – Elena I. Lebedeva

A.S. Babenka – Candidate of Chemical Sciences, associate professor of the Chair of Bioorganic chemistry, Belarusian State Medical University, <https://orcid.org/0000-0003-1309-4248>

A.T. Shchastnyy – Doctor of Medical Sciences, professor, rector, head of the Chair of Hospital Surgery with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, <https://orcid.org/0000-0003-2796-4240>