

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 576.38+577.215.3+616.36-004

Уровень экспрессии мРНК CXCL12 как независимый маркер прогрессирования фиброза печени у крыс**Е.И. Лебедева^{1,*} , А.С. Бабенко² , А.Т. Щастный¹ **¹*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Республика Беларусь, 210009, г. Витебск, пр-т Фрунзе, д. 27;*²*Белорусский государственный медицинский университет, Республика Беларусь, 220116, г. Минск, пр. Дзержинского, д. 83, корп. 15***e-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru*

К настоящему времени накопленные знания о роли хемокина CXCL12 в инициации и развитии фиброза печени немногочисленны и не позволяют оценить потенциал использования уровня мРНК CXCL12 в качестве независимого маркера фиброгенеза и процессов, связанных с фиброзом и циррозом. При моделировании тиаоацетамидом фиброза и цирроза печени у крыс-самцов Wistar на всех стадиях прогрессирования фиброза установлен низкий уровень экспрессии мРНК CXCL12 ($p < 0,0001$) по сравнению с контрольной группой крыс. В начале эксперимента (3 нед.) выявили интенсивное снижение уровня экспрессии мРНК CXCL12 в 2,93 раза ($p < 0,0001$). С 3 по 9 нед. уровень экспрессии гена снижался постепенно ($p < 0,0001$). Перестройка паренхимы органа и формирование ложных печеночных узелков (11, 13 и 15 нед.) не сопровождалось изменением уровня экспрессии гена. При тотальном формировании ложных печеночных узелков и выраженном диффузном разрастании соединительной ткани (17 нед.) отмечался незначительный рост уровня экспрессии мРНК CXCL12. Полученные нами результаты позволяют предположить, что уровень экспрессии мРНК CXCL12 связан с процессами фиброза и цирроза. мРНК CXCL12 может выступать в роли независимого маркера фиброгенеза, но не цирроза печени на фоне токсического повреждения ее тиаоацетамидом. При проведении фундаментальных, доклинических исследований по оценке эффективности антифибротических лекарственных средств с использованием данной экспериментальной модели и динамики патологического процесса минимально допустимым числом контрольных точек считаем три, а именно: портальный фиброз (3 нед.), мостовидный фиброз (5 нед.), начало процесса трансформации фиброза печени в цирроз (9 нед.).

Ключевые слова: фиброз печени, цирроз печени, интоксикация тиаоацетамидом, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, уровень экспрессии мРНК CXCL12, шкала Ishak K.G.

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-2022-77-4-248-257

Хемокин CXCL12 конститутивно экспрессируется во многих тканях человека и животных [1]. Посредством связывания с рецептором (CXCR4) CXCL12 активирует много сигнальных путей, которые отвечают за хемотаксис, миграцию клеток, их адгезию, пролиферацию и др. [2]. Большое количество работ посвящено изучению роли и механизмов действия CXCL12 на примере канцерогенеза. Комплексы CXCL12/CXCR4 и CXCL12/CXCR7 являются мишенями для специфических ингибиторов в ходе таргетной терапии ряда опухолей [3]. Одной из главных ролей CXCL12 в развитии опухоли является стимуляция миграции ряда клеток. Однако на данный момент раскрыть достаточное количество деталей механизмов работы CXCL12 не удалось [4].

Значительно меньше работ посвящено роли CXCL12 в инициации и развитии фиброза в раз-

личных органах. Некоторые авторы считают, что в ходе фиброза CXCL12 не только выполняет важную функцию, но и должен рассматриваться как мишень для таргетной терапии фиброза. Это связано с тем, что по аналогии с опухолями, при фиброзе CXCL12 стимулирует миграцию ряда клеток, способствуя его инициации и прогрессированию [5]. Ранее проведенные исследования показали, что ингибирование CXCL12 само по себе пока не оправдывает надежд в отношении терапии фиброза. Напротив, ингибирование его рецептора CXCR4 демонстрирует выраженный терапевтический эффект [6]. Наряду с этим некоторые исследования показывают, что тяжесть и скорость развития фиброза может зависеть от наличия однонуклеотидных замен в структуре гена CXCL12 [7]. Наконец, не стоит упускать из вида и наличие ряда альтернативных сплайс-

вариантов мРНК и изоформ собственно белка *CXCL12*. По мнению некоторых авторов, регуляция экспрессии *CXCL12* осуществляется преимущественно на уровне сплайсинга, а не транскрипции. Различные сплайс-варианты связываются с рецепторами *CXCR4* и *CXCR7*, но характеризуются разными свойствами [8].

К сожалению, даже при наличии всего арсенала современных методов, пока не представляется возможным разобраться в механизмах того или иного патологического процесса в печени методом *in vivo*. Использование клеточных моделей не позволяет воспроизвести постоянно меняющееся состояние микроокружения в печени. Это, в свою очередь, приводит к накоплению противоречивых результатов. В отношении роли *CXCL12* в инициации и развитии фиброза печени также существует ряд вопросов. В частности, первые данные свидетельствовали о том, что уровень белка и мРНК при фиброзе увеличивается и связан с его прогрессированием. Однако позже были получены результаты, согласно которым в зависимости от выбранной модели уровни белка *CXCL12* и мРНК *CXCL12* могут как расти, так и уменьшаться [9].

В изученной литературе отсутствуют исследования, направленные на возможность использования мРНК *CXCL12* как независимого маркера фиброгенеза печени и процессов, связанных с фиброзом и циррозом. Мы не нашли данных об использовании уровня экспрессии мРНК гена для определения направленности процесса в сторону регенерации органа или в сторону прогрессирования фиброза.

В данной работе мы оценивали потенциал использования уровня экспрессии мРНК *CXCL12* в качестве независимого маркера фиброгенеза печени.

Материалы и методы

В рамках настоящей работы были использованы международные термины по цитологии и гистологии [10], а при описании генов применяли названия терминов, принятые в Guidelines for Nomenclature of Genes, Genetic Markers, Alleles, and Mutations in Mouse and Rat (<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>).

Протокол исследования на крыс-самцах Wistar весом от 190–210 г. был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными при учреждении образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (протокол № 6 от 03.01.2019). Фиброз и цирроз печени вызывали путем хронической интоксикации крыс тиаоацетамидом (ТАА). В литературе распространена модель внутрибрюшинного введения ТАА в дозе 300 мг/кг 3 раза в нед. Применение данной методики оказалось невозможным

ввиду образования воспаления в местах инъекции раствора и массовой гибели крыс от острой печеночной недостаточности. В связи с этим использовали отработанную опытным путем другую схему эксперимента. Свежеприготовленный раствор ТАА вводили в желудок с помощью зонда (интрагастрально) в дозе 200 мг/кг массы тела крысы 2 раза в нед. в течение 17 нед. Крысы контрольной группы получали аналогичный объем воды без ТАА. Во время эксперимента летальность составила 9 животных (на 2-й, 9-й, 12-й и 15-й нед.). Распределение животных по группам представлено в табл. 1.

Таблица 1

Количество и распределение по группам крыс Wistar в эксперименте

Наименование группы	Продолжительность эксперимента, недели	Количество крыс в группе
m0 контрольная	17	12
m1	3	12
m2	5	12
m3	7	12
m4	9	12
m5	11	12
m6	13	12
m7	15	12
m8	17	12

Забор биологического материала и пробоподготовка. После декапитации из большой левой доли печени крыс скальпелем забирали фрагменты органа диаметром не более 5 мм, помещали в криобирки и далее в жидкий азот для транспортировки и хранения непосредственно до начала процедуры выделения суммарной РНК. Гомогенизацию 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» (АртБиоТех, Беларусь) согласно протоколу производителя. После процедуры выделения и очистки суммарную РНК элюировали с мини-колонок с помощью свободной от РНКаз воды milli-Q, входящей в состав набора. Контроль качественных характеристик образцов выполняли с помощью электрофореза в агарозном геле (выборочно) без денатурирующих условий (однократный ТРИС-ацетатный буфер, двухпроцентный агарозный гель). Количество суммарной РНК после выделения определяли с помощью спектрофотометрии при длине волны 260 нм на приборе Specord 250 (Analytic Jena, Германия).

Обратная транскрипция. Синтез кДНК проводили с использованием олиго-dT праймеров и набора реагентов ArtMMLV Total (АртБиоТех,

Беларусь) в соответствии с инструкцией производителя. Для одной реакции применяли одинаковое стартовое количество суммарной РНК – 200 нг/реакцию.

Метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). При выполнении ПЦР-РВ использовали реагенты производства компании «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 Таq-ДНК-полимеразы с соответствующим буферным раствором. Режим термоциклирования: +95°C – 2 мин, затем 40 циклов: +95°C – 5 сек, +60°C – 45 сек. В работе использовали прибор CFX96touch (BioRad, США). Эффективность реакций определяли с помощью метода стандартной кривой и серий разведений концентрированных образцов кДНК с шагом в 5 раз. Критерием удовлетворительной эффективности считали не менее 95%. Все реакции проводили в трех повторностях. Для оценки относительного уровня мРНК CXCL12 использовали метод 2^{-dCt}.

Олигонуклеотиды. Выбор олигонуклеотидных праймеров и зондов проводили 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>). Перечень выбранных молекулярных мишеней и кандидатов в референсные гены представлен в табл. 2.

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. Последовательности выбранных олигонуклеотидных праймеров и зондов представлены в табл. 3.

Нормализация данных ПЦР-РВ. В качестве референсного гена для нормализации данных ПЦР-РВ использовали HES1, характеризующийся наименьшим разбросом значений во всех экспериментальных группах. В предварительном исследовании

Таблица 2

Характеристика гена-мишени и кандидатов в референсные гены				
Название гена	Статус	NCBI Gene ID	Референсная последовательность мРНК	Кодируемый белок
CXCL12	мишень	24772	NM_001033883.1	Хемокин подсемейства CXC
HPRT1	кандидат в референсные гены	24465	NM_012583.2	Гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансфераза (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1)
SDHA	кандидат в референсные гены	157074	NM_130428.1	Субъединица А флавопротеина, входящего в комплекс сукцинат-убихинон-оксидоредуктаза (succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A)
HES1*	кандидат в референсные гены	29577	NM_024360.4	Базовая спираль–петля–спираль 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 мы установили высокий уровень стабильности экспрессии (стандартное отклонение менее одного цикла), первоначально рассматривался как ген-мишень.

Таблица 3

Последовательности специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов

Ген	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	
CXCL12	Прямой	CAGATTGTTGCAAGGCTGAA
	Обратный	TCCACTTTAATTTCTGGGTCAA
	Зонд	FAM-AAGCAACAACAGACAAGTGTGCA-BHQ1
HPRT1	Прямой	GGACAGGACTGAAAGACTTGCT
	Обратный	ACAGAGGGCCACAATGTGAT
	Зонд	FAM-CATGAAGGAGATGGGAGGCC-BHQ1
SDHA	Прямой	CCCACAGGTATCTATGGTGCT
	Обратный	TGGCTGTTGATGAGAATGC
	Зонд	FAM-CATCACAGAAGGGTGCCGTG-BHQ1
HES1	Прямой	GAAAGATAGCTCCCGGCATT
	Обратный	CGGAGGTGCTTCACTGTTCAT
	Зонд	FAM-CCAAGCTGGAGAAGGCAGACA-BHQ1

довании (данные не приводятся) не обнаружили изменений уровня экспрессии мРНК этого гена в ответ на экспериментальное воздействие в течение всего периода наблюдений (17 нед.). Использование SDHA и HPRT1, а также их комбинации не повышало точность оценки и не вносило принципиальных изменений в конечные расчеты.

Гистологическое исследование. Образцы печени диаметром 5–10 мм помещали в 10%-ный раствор нейтрального формалина на фосфатном буфере и фиксировали в течение 24 ч. Затем проводили обработку фиксированного материала с последующей заливкой в парафин с использованием автомата для гистологической обработки ткани STP-120 (Thermo Fisher Scientific, Германия) и станции для заливки ткани парафином EC350 (Thermo Fisher Scientific, Германия). С помощью ротационного микротомы HM340E (MICROM Laborgerate GmbH, Германия) изготавливали 3–4 среза толщиной 4 мкм и помещали их на предметные стекла. Для получения обзорных гистологических препаратов срезы печени окрашивали гематоксилином и эозином, а для выявления соединительной ткани – по методу Маллори в автоматическом программируемом приборе для цитологических и гистологических исследований HMS70 (Thermo Fisher Scientific, Германия). При выборе метода окраски соединительной ткани в печени остановились на окраске по методу Маллори, используемой в нашей лаборатории.

Морфометрический анализ. На гистологических препаратах с использованием компьютерных программ ImageScope Color и cellSens Standard определяли отношение площади соединительной ткани (в процентах) к общей площади среза [11]. Измерения осуществляли путем микрофото съемки случайных полей зрения препаратов печени цифровой камерой OLYMPUS XC30 (Япония) на базе микроскопа OLYMPUS BX51 (Япония) при увеличении объектива 20× (не менее 3 полей зрения в каждом гистологическом срезе). Степень фиброза печени определяли согласно полуколичественной шкале К.Г. Ишака (табл. 4) [12].

Статистический анализ. Результаты количественных измерений оценивали с использованием программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc. США), IBM SPSS Statistics 23.0 (An IBM Company, 28.0.1, США), Microsoft Office Excel (Microsoft Corp., США).

В выборках для каждой недели эксперимента определяли нормальность частотного распределения признака по критерию Лиллиефорса. Получали описательные статистики и описывали количественные экспериментальные данные в виде средних и их соответствующих доверительных интервалов ДИ (среднее – М (95% ДИ: j-q)), медианы и значения 15-го – 85-го процентилей (медиана – Ме (15%-ный перцентиль; 85%-ный перцентиль)). Об уровне статистической значимости различий изучаемых признаков в группах с нормальным частотным распределением данных судили по t-критерию Стьюдента; в случае отличия выборок от нормального частотного распределения использовали U-критерий Манна-Уитни. Для выявления наличия зависимости и ее силы между изучаемыми признаками использовали непараметрическую ранговую корреляцию Спирмена.

Для наглядности результаты статистической обработки данных представили в виде графиков однофакторного параметрического дисперсионного анализа. Так как во всех группах было одинаковое количество исследуемых признаков, считали допустимым использовать параметрический дисперсионный анализ [13].

Результаты

Морфологический анализ печени крыс. В печени интактных крыс соединительная ткань выявлялась в незначительном количестве вокруг сосудов триад, центральных и собирательных вен в виде тонких коллагеновых волокон (рис. 1А). Степень фиброза по шкале К.Г. Ишака соответствовала F0.

На раннем сроке эксперимента (3 нед.) отмечался портальный фиброз печени F1. Мостовидный фиброз не выявили.

Таблица 4

Стадии фиброза печени по шкале К.Г. Ишака

Стадии фиброза по шкале К.Г. Ишака	Морфологическая характеристика степени выраженности фиброза
F0	Фиброз отсутствует
F1	Фиброзное расширение портальных зон с короткими фиброзными септами и без них
F2	Фиброзное расширение большинства портальных зон с короткими фиброзными септами и без них
F3	Фиброзное расширение большинства портальных зон с единичными мостовидными портопортальными септами
F4	Фиброзное расширение большинства портальных зон с выраженными мостовидными портопортальными и портоцентральными септами
F5	Многочисленные мостовидные септы с единичными узелками (неполный цирроз)
F6	Цирроз достоверный

По истечении 5–7 нед. интоксикации крыс ТАА в паренхиме печени обнаружили порталный, мостовидный, местами центрлобулярный и диффузный перичеселлюлярный, фиброз F2/F3 и F3/F4 соответственно (рис. 1Б).

При дальнейшей интоксикации крыс и прогрессировании фиброза печени (9 нед., F4/F5) в гистологических препаратах в области отдельных порталных зон наблюдали единичные ложные печеночные дольки, формирование которых отражает начало процесса трансформации фиброза печени в цирроз (рис. 1В).

По окончании 11 нед. эксперимента на гистологических препаратах выявили диффузную перестройку паренхимы печени с формированием ложных печеночных долек, что соответствовало степени фиброза F5. Интересно отметить, что в период с 9-й по 11-ю нед. в печени крыс не наблюдали процесс увеличения зон некроза на местах полей вакуольной дистрофии и некробиоза гепатоцитов. При этом установили значительное

разрастание соединительной ткани вокруг порталных зон и формирование толстых соединительнотканых септ по периферии ложных печеночных долек.

На следующем этапе эксперимента (13 нед.) морфологически выявили тотальное поражение печени крыс (достоверный цирроз, F6). На срезах гистологических препаратов отмечали образование ложных печеночных узелков разного диаметра и формы (рис. 1Г).

К концу эксперимента (15–17 нед.) наблюдали выраженное диффузное разрастание соединительнотканых септ, формирование новых ложных печеночных долек за счет разделения крупных долек тонкими соединительноткаными септами, а также выраженный диффузный порталный, перипортальный и перичеселлюлярный фиброз. Установлено, что в различных участках одного и того же среза прогрессирование патологических изменений было выражено с различной степенью интенсивности.

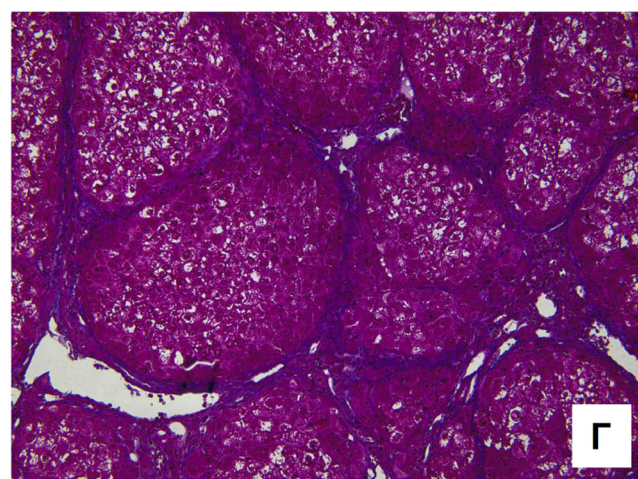
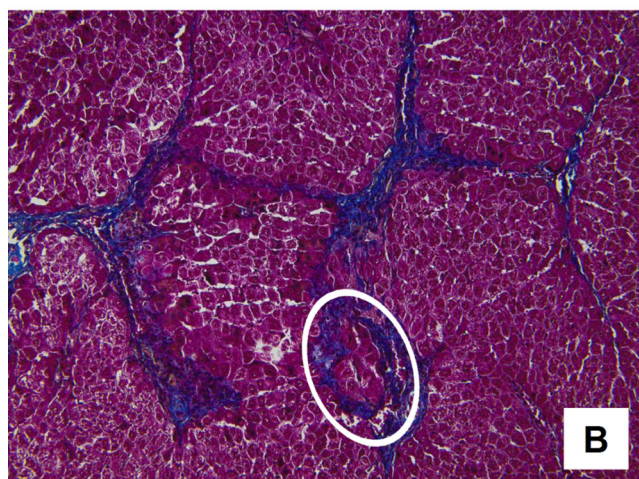
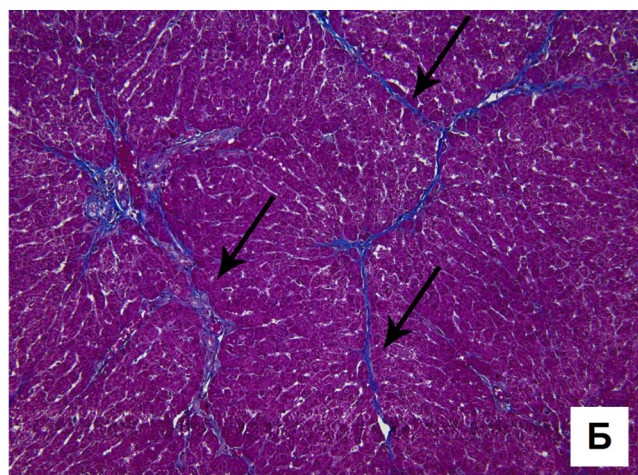
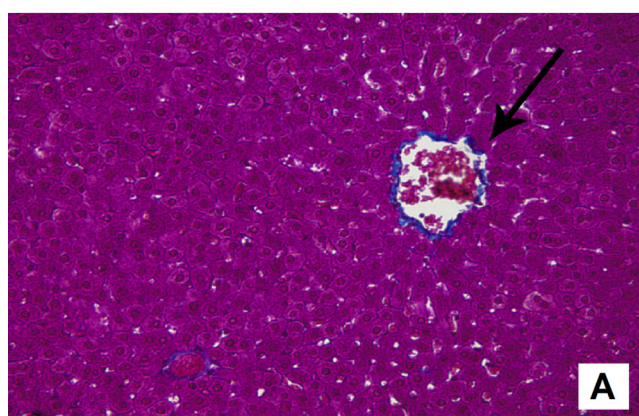


Рис. 1. Фрагменты печени крыс. Окраска по методу Маллори. А — фрагмент печени крысы контрольной группы, незначительное количество соединительной ткани в области центральной вены отмечено стрелкой, увел. 400×; Б — фрагмент печени крысы с индуцированным циррозом через 5 нед. после начала эксперимента, соединительнотканые септы между порталными зонами (мостовидный фиброз) отмечены стрелками, увел. 200×; В — фрагмент печени крысы с индуцированным циррозом через 9 нед. после начала эксперимента, сформированная ложная печеночная долька выделена рамкой овальной формы, увел. 200×; Г — фрагмент печени крысы с индуцированным циррозом через 13 нед. после начала эксперимента, видны сформированные ложные печеночные дольки, увел. 200×.

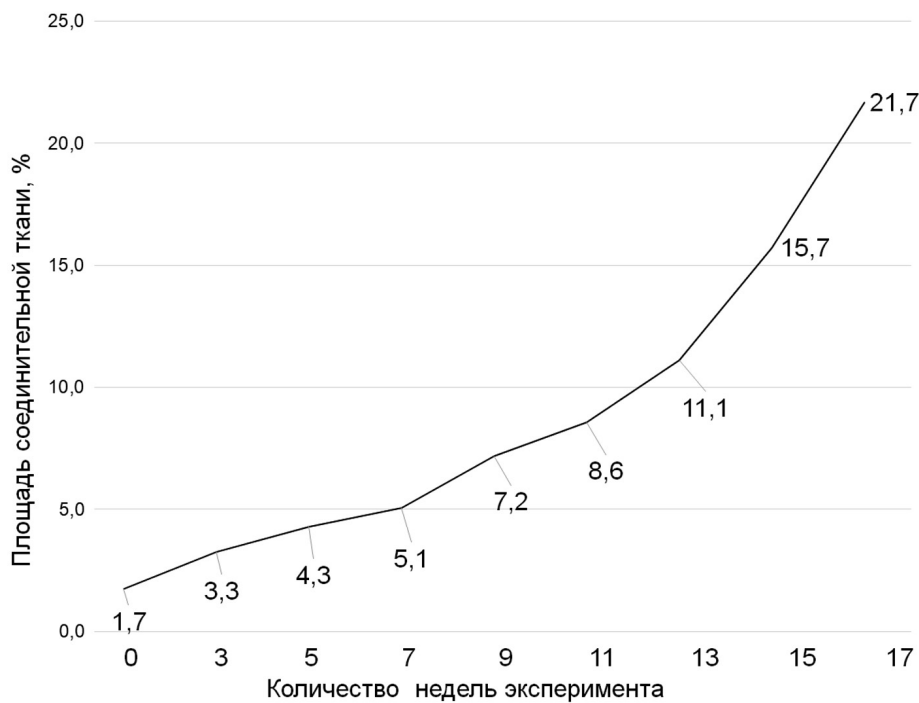


Рис. 2. Изменения площади соединительной ткани в процентах к общей площади гистологического среза при ТАА-индуцированном фиброгенезе печени крыс Wistar

Изменение площади соединительной ткани. На рис. 2 представлен график изменения площади соединительной ткани на протяжении всего эксперимента. До стадии фиброза F5 (неполный цирроз, 11 нед.) отмечали процесс постепенного увеличения площади соединительной ткани. Вместе с тем к концу 17 нед. происходило ее интенсивное разрастание и увеличение в 14,00 раз ($p < 0,0001$) по сравнению с контрольной группой.

Следует обратить внимание на факт того, что при попарном сравнении нед. эксперимента между собой отличий не выявлено: между контрольной группой и 3 нед. ($p = 0,6759$), между 3 и 5 нед. ($p = 0,9560$), между 3 и 7 нед. ($p = 0,4433$), между 5 и 7 нед. ($p = 0,9936$).

Динамика уровня экспрессии мРНК гена *CXCL12*. На всех стадиях фиброза и цирроза в печени крыс-самцов Wistar установлен низкий уровень экспрессии мРНК *CXCL12* ($p < 0,0001$) по сравнению с контрольной группой крыс. Изменение уровня экспрессии гена представлены в табл. 5 и рис. 3. В начале эксперимента (3 нед.) установили резкое снижение уровня экспрессии мРНК *CXCL12* в 2,93 раза ($p < 0,0001$) по сравнению с контрольной группой.

С 3 по 9 нед. уровень экспрессии гена уменьшался постепенно ($p < 0,0001$). Перестройка паренхимы органа и формирование ложных печеночных узелков (11, 13 и 15 нед.) не сопровождалось изменением уровня экспрессии гена. При тотальном образовании ложных печеночных узелков и выраженном диффузном разрастании соедини-

тельной ткани (17 нед.) происходил незначительный рост уровня экспрессии мРНК *CXCL12*.

Таблица 5

Уровень экспрессии мРНК *CXCL12* в ходе эксперимента

Группы животных/недели эксперимента	Относительный уровень экспрессии мРНК <i>CXCL12</i> (Ме (15%;85%))
m0/17, контрольная	11,719 (6,062;21,112)
m1/3	4,00 (3,138;6,498)
m2/5	2,261 (1,214;4,199)
m3/7	1,866 (1,197;3,758)
m4/9	0,850 (0,726;0,974)
m5/11	0,663 (0,583;0,744)
m6/13	0,651 (0,510;0,792)
m7/15	0,456 (0,267;0,615)
m8/17	0,872 (0,435;2,462)

Методом непараметрической ранговой корреляции Спирмена между уровнем экспрессии мРНК *CXCL12* и степенью фиброза в двух экспериментальных точках выявлена корреляционная связь: на стадии портального фиброза F1 – прямая умеренной силы ($r = 0,37$, $p < 0,05$) и на стадии мостовидного фиброза F3/F4 – обратная умеренной силы ($r = -0,36$, $p < 0,05$). Силу связи оценивали с использованием коэффициентов общей корреляции [13].

Исследования показали, что с одной стороны наблюдали тенденцию к росту площади соединительной ткани, а с другой – определили снижение уровня экспрессии мРНК *CXCL12*.

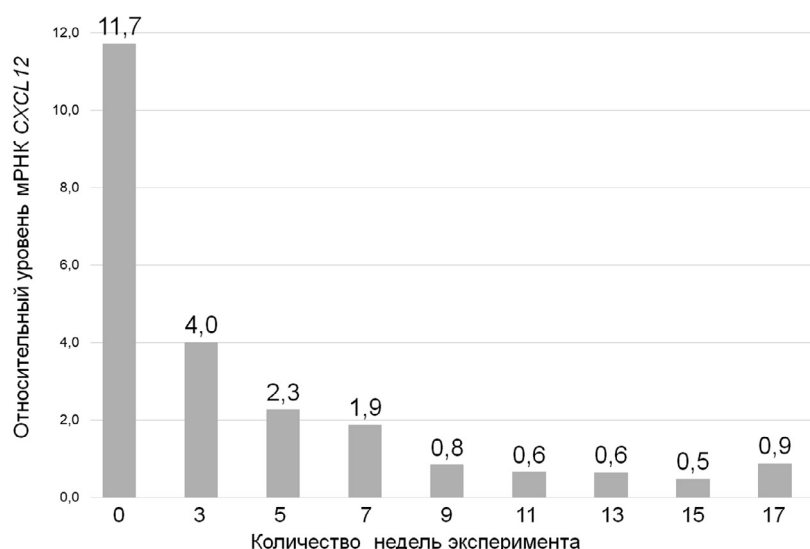


Рис. 3. Изменения относительного уровня мРНК *CXCL12* при ТАА-индуцированном фиброгенезе печени крыс Wistar

Обсуждение результатов

Анализ литературы выявил существенные пробелы в изучении уровней экспрессии мРНК *CXCL12* и белка *CXCL12* на конкретных стадиях (сроках) фиброза [14, 15]. Выбор экспериментальной модели в настоящем исследовании был обоснован тем, что у лабораторных животных ТАА вызывает поражение печени с морфологическими характеристиками, аналогичными таковым у людей с фиброзом и циррозом печени [16]. Крысы Wistar являются часто используемым объектом при проведении доклинических исследований по оценке эффективности лекарственных средств и их конечного лечебного эффекта. В научной литературе данные, посвященные уровню экспрессии мРНК *CXCL12* с применением такой экспериментальной модели, практически не встречаются.

Особое внимание мы уделяли длительности эксперимента и подробному морфологическому стадированию фиброза по шкале К.Г. Ишака F0-F6. Следует отметить, что в работах, по изучению уровня экспрессии мРНК *CXCL12*, исследователи практически не уделяли внимания нормализации данных ПЦР-РВ. Практически не встречается обоснование выбора референсного гена и лишь в отдельных случаях — отсылки на соблюдение правил MIQE [8, 9, 17]. Это может быть одной из причин получения противоречивых данных о роли *CXCL12* в процессах инициации и развития фибротических изменений.

В наших исследованиях принципиальным направлением являлось использования показателей уровня экспрессии мРНК *CXCL12* в качестве независимого маркера фиброгенеза печени. На всех стадиях прогрессирования фиброза установлен низкий уровень экспрессии мРНК *CXCL12* ($p < 0,0001$) по сравнению с контрольной группой.

На стадии портального фиброза отмечено резкое снижение уровня экспрессии мРНК *CXCL12* (3 нед., $p < 0,0001$). Далее до начала трансформации фиброза печени в цирроз (с 3-й по 9-ю нед.) наблюдали его постепенное снижение ($p < 0,0001$). Перестройка паренхимы органа и формирование ложных печеночных узелков (с 11-й по 15-ю нед.) не приводили к изменению уровня экспрессии мРНК *CXCL12*. При этом к концу эксперимента (17 нед.) установили его незначительный рост.

Фиброз и цирроз печени крыс сопровождается миграцией в орган гемопоэтических клеток из костного мозга, капилляризацией синусоидных капилляров, трансдифференцировкой макрофагов в различные субпопуляции, активацией жиронакапливающих клеток в миофибробластический фенотип и индукцией молекулярных каскадов ряда сигнальных путей, находящихся в условиях физиологической нормы в состоянии ингибирования [18–26]. Какие из этих процессов связаны со снижением уровня экспрессии мРНК *CXCL12* предстоит изучить в дальнейшем.

Одной из важных задач исследования стало изучение связи между уровнем экспрессии мРНК *CXCL12* и процессами прогрессирования и регресса фиброза печени. Эта информация может быть чрезвычайно полезна для клинической практики, где оценка динамики патологического процесса во времени на фоне терапии имеет большое значение. Полученные нами данные показали, что оценка уровня экспрессии мРНК *CXCL12* действительно может указать на направленность процесса и косвенно свидетельствовать об успешности или неоправданности используемых терапевтических подходов. Снижение уровня экс-

прессии мРНК является фактором неблагоприятного прогноза при фиброзе. Однако при наступлении цирроза уровень экспрессии мРНК *CXCL12* остается практически неизменным и теряет прогностическую значимость. Таким образом, уровень экспрессии мРНК может быть маркером динамики фиброза, но не цирроза печени на фоне токсического ее повреждения ТАА.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют предположить, что уровень экспрессии мРНК *CXCL12* связан с процессами фиброза/цирроза и может выступать в роли независимого маркера только фиброгенеза, но не цирроза печени на фоне токсического повреждения ее ТАА. При проведении фундаментальных, доклинических исследований по оценке эффективности антифибротических лекарственных средств с использованием данной экспериментальной модели и контроле динамики патологического процесса минимально допустимым числом контрольных точек считаем три, а именно: портальный фиброз (3 нед.), мостовидный фиброз (5 нед.), начало процесса трансформация фиброза печени в цирроз (9 нед.). На данной модели цирроза выбор этих точек мы обосновываем тем, что инициация фиброза начинается вокруг портальных зон. Соединительнотканые септы с тяжами из полиморфных клеток разной степени дифференциров-

ки направлялись через паренхиму от одних портальных зон печени в сторону соседних портальных зон, таким образом обозначая путь для разрастания соединительной ткани.

Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований «Фундаментальные и прикладные науки — медицине» Министерства Здравоохранения Республики Беларусь, задание 2.89 «Изучить роль экспрессии генов NOTCH- и TWEAK-сигнальных путей, участвующих в процессах пролиферации и дифференцировки клеток печени в норме и при ее токсическом поражении», № 20190107. Протокол эксперимента был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными при учреждении образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (протокол № 6 от 03.01.2019 г). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с рекомендациями Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях от 18.03.1986, Директиве Совета ЕЭС от 24.11.1986 и рекомендациям FELASA Working Group Report (1994—1996). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhou W., Guo S., Liu M., Burow M.E., Wang G. Targeting CXCL12/CXCR4 axis in tumor immunotherapy // *Curr. Med. Chem.* 2019. Vol. 26. N 17. P. 3026—3041.
2. Dewan M.Z., Ahmed S., Iwasaki Y., Ohba K., Toi M., Yamamoto N. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer // *Biomed. Pharmacother.* 2006. Vol. 60. N 6. P. 273—276.
3. Khare T., Bissonnette M., Khare S. CXCL12-CXCR4/CXCR7 axis in colorectal cancer: Therapeutic target in preclinical and clinical studies // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22. N 14: 7371.
4. Ray P., Stacer A.C., Fenner J., Cavnar S.P., Meguiar K., Brown M., Luker K.E., Luker G.D. CXCL12-γ in primary tumors drives breast cancer metastasis // *Oncogene*. 2015. Vol. 34. N 16. P. 2043—2051.
5. Qin L., Qin J., Zhen X., Yang Q., Huang L. Curcumin protects against hepatic stellate cells activation and migration by inhibiting the CXCL12/CXCR4 biological axis in liver fibrosis: A study *in vitro* and *in vivo* // *Biomed. Pharmacother.* 2018. Vol. 101. P. 599—607.
6. Cui L.N., Zheng X.H., Yu J.H., Han Y. Role of CXCL12-CXCR4/CXCR7 signal axis in liver regeneration and liver fibrosis // *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2021. Vol. 29. N 9. P. 900—903.
7. Chiraunyanann T., Changsri K., Sretapunya W., Yuenyongchaiwat K., Akekawatchai C. CXCL12 G801A polymorphism is associated with significant liver fibrosis in HIV-infected Thais: a cross-sectional study // *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 2019. Vol. 37. N 3. P. 162—170.
8. Janowski M. Functional diversity of SDF-1 splicing variants // *Cell Adh. Migr.* 2009. Vol. 3. N 3. P. 243—249.
9. Korbecki J., Kojder K., Kapczuk P., Kupnicka P., Gawrońska-Szklarz B., Gutowska I., Chlubek D., Baranowska-Bosiacka I. The effect of hypoxia on the expression of CXC chemokines and CXC chemokine receptors — A review of literature // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22. N 2: 843.
10. Банин В.В., Быков В.Л. (ред.). Международные термины по цитологии и гистологии человека с официальным списком русских эквивалентов. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 272 с.
11. Guerrier M., Attili F., Alpini G., Glaser S. Prolonged administration of secretin to normal rats increases biliary proliferation and secretin-induced ductal secretory activity // *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 2014. Vol. 3. N 3. P. 118—125.
12. Everhart J.E., Wright E.C., Goodman Z.D., et al. Prognostic value of Ishak fibrosis stage: findings from the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial // *Hepatology*. 2010. Vol. 51. N 2. P. 585—594.
13. Жижин К.С. Медицинская статистика: Учебное пособие. Ростов-на-Дону: Феникс, 2007. 160 с.
14. Liu Y., Yang X., Jing Y., Zhang S., Zong C., Jiang J., Sun K., Li R., Gao L., Zhao X., Wu D., Shi Y., Han Z., Wei L. Contribution and mobilization of mesenchymal stem cells in a mouse model of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5. N 2: 17762.
15. King A., Houlihan D.D., Kavanagh D., et al. Sphingosine-1-phosphate prevents egress of hematopoietic

stem cells from liver to reduce fibrosis // *Gastroenterology*. 2017. Vol. 153. N 1. P. 233–248.e16.

16. Muthiah M.D., Huang D.Q., Zhou L., Jumat N. H., Choolani M., Chan J.K.Y., Wee A., Lim S.G., Dan Y.Y. A murine model demonstrating reversal of structural and functional correlates of cirrhosis with progenitor cell transplantation // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9. N 1: 15446.

17. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments // *Clin. Chem.* 2009. Vol. 55. N 4. P. 611–622.

18. Watanabe Y., Tsuchiya A., Seino S., Kawata Y., Kojima Y., Ikarashi S., Starkey Lewis P.J., Lu W.Y., Kikuta J., Kawai H., Yamagiwa S., Forbes S.J., Ishii M., Terai S. Mesenchymal stem cells and induced bone marrow-derived macrophages synergistically improve liver fibrosis in mice stem cells // *Transl. Med.* 2019. Vol. 8. N 3. P. 271–284.

19. Wang J., Sun M., Liu W., Li Y., Li M. Stem cell-based therapies for liver diseases: An overview and update // *Tissue Eng. Regen. Med.* 2019. Vol. 16. N 2. P. 107–118.

20. Griessmair L., Pirringer L., Mountford S., Sendelhofert A., Makeschin M.C., Koletzko S., Mayr D., Bufler P. Expression of IL-37 correlates with immune cell infiltrate and fibrosis in pediatric autoimmune liver diseases // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2022. Vol. 74. N 11. P. 742–749.

21. Ogawa H., Kaji K., Nishimura N., Takagi H., Ishida K., Takaya H., Kawaratani H., Moriya K., Namisaki T.,

Akahane T., Yoshiji H. Lenvatinib prevents liver fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation and sinusoidal capillarization in experimental liver fibrosis // *J. Cell. Mol. Med.* 2021. Vol. 25. N 8. P. 4001–4013.

22. Cheng Q., Li C., Yang C.F., Zhong Y.J., Wu D., Shi L., Chen L., Li Y.W., Li L. Methyl ferulic acid attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation through the TGF- β /Smad and NOX4/ROS pathways // *Chem. Biol. Interact.* 2019. Vol. 299. P. 131–139.

23. Wen Y., Lambrecht J., Ju C., Tacke F. Hepatic macrophages in liver homeostasis and diseases-diversity, plasticity and therapeutic opportunities // *Cell. Mol. Immunol.* 2021. Vol. 18. N 1. P. 45–56.

24. Mu M., Zuo S., Wu R.M., Deng K.S., Lu S., Zhu J.J., Zou G.L., Yang J., Cheng M.L., Zhao X.K. Ferulic acid attenuates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation via inhibition of TGF- β /Smad signaling pathway // *Drug Des. Devel. Ther.* 2018. Vol. 12. P. 4107–4115.

25. Xiang D., Zou J., Zhu X., Chen X., Luo J., Kong L., Zhang H. Physalin D attenuates hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by blocking TGF- β /Smad and YAP signaling // *Phytomedicine*. 2020. Vol. 78: 153294.

26. Ni M.M., Wang Y.R., Wu W.W., Xia C.C., Zhang Y.H., Xu J., Xu T., Li J. Novel insights on Notch signaling pathways in liver fibrosis // *Eur. J. Pharmacol.* 2018. Vol. 826. P. 66–74.

Поступила в редакцию 26.07.2022

После доработки 05.10.2022

Принята в печать 09.11.2022

RESEARCH ARTICLE

CXCL12 mRNA expression as an independent marker of liver fibrogenesis in rats

E.I. Lebedeva^{1,*} , A.S. Babenka² , A.T. Shchastny¹ 

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

²Belarussian State Medical University, Republic of Belarus, 220116, Minsk, 83–15 Dzerzhinsky ave.

*e-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru

The accumulated knowledge about the role of the CXCL12 chemokine in the initiation and development of liver fibrosis is insignificant and does not allow us to assess the potential of using the CXCL12 mRNA level as an independent marker of fibrogenesis and processes associated with fibrosis and cirrhosis. Thioacetamide modeling of liver fibrosis and cirrhosis in male Wistar rats showed a low level of CXCL12 mRNA expression ($p = 0.0000$) at all stages of fibrosis progression. At the beginning of the experiment (3 weeks), a decrease in the level of CXCL12 mRNA by 2.93 times ($p = 0.0000$) compared with the control group was revealed. After 3, 7 and 9 weeks, the level of gene expression decreased gradually ($p = 0.0000$). During the reorganization of the parenchyma of the organ and the formation of false hepatic nodules (11, 13 and 15 weeks), a certain stabilization of the level of gene expression was noted. Against the background of the total formation of pseudohepatic nodules and a pronounced diffuse proliferation of connective tissue (17 weeks), the level of CXCL12 mRNA expression increased, but did not reach the level of control values. Based on our results, the level of CXCL12 mRNA is associated with the processes of fibrosis/cirrhosis and can act as an independent marker of fibrogenesis, but not cirrhosis of the liver against the background of toxic damage to it by thioacetamide. When conducting fundamental and preclinical studies to evaluate the effectiveness of drugs using this experimental model, the minimum allowable number of control points is considered to be three, namely: portal fibrosis (3 weeks), bridging fibrosis (5 weeks), the beginning of the process of transformation of liver fibrosis into cirrhosis (9 weeks).

Keywords: *liver fibrosis and liver cirrhosis, thioacetamide intoxication, real-time polymerase chain reaction, CXCL12 mRNA expression level, scale K.G. Ishak*

Funding: The work was carried out within the framework of the state research program “Fundamental and Applied Sciences for Medicine” of the Ministry of Health of the Republic of Belarus, task 2.89 “To study the role of the expression of NOTCH- and TWEAK-signaling pathway genes involved in the processes of proliferation and differentiation of liver cells in normal conditions and in its toxic defeat”, No. 20190107.

Сведения об авторах

Лебедева Елена Ивановна — канд. биол. наук, доц. кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии Витебского государственного ордена Дружбы народов медицинского университета. Тел.: +375-212-60-14-29; e-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1309-4248>

Бабенко Андрей Сергеевич — канд. хим. наук, доц. кафедры биоорганической химии Белорусского государственного медицинского университета. Тел.: + 375-017-279-42-13; e-mail: labmdbt@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5513-970X>

Щастный Анатолий Тадеушевич — докт. мед. наук, ректор, зав. кафедрой хирургии ФПК и ПК Витебского государственного ордена Дружбы народов медицинского университета. Тел.: + 375-212-60-13-95; e-mail: admin@vsmu.by; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2796-4240>