УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Объект авторского права
УДК 616.36-004:577.21

ЛЕБЕДЕВА
Елена Ивановна

КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФИБРОГЕНЕЗА ПЕЧЕНИ В ПРОЦЕССЕ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ФИБРОЗА В ЦИРРОЗ

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

по специальности
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Минск. 2026

Научная работа выполнена в учреждении образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Научный консультант:	**Щастный Анатолий Тадеушевич,** доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой госпитальной хирургии с курсом ФПК и ПК учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»
Официальные оппоненты:	**Зиматкин Сергей Михайлович,** доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет»
	Безбородкина Наталья Николаевна, доктор биологических наук, ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Зоологический институт Российской Академии Наук
	Кривенко Светлана Ивановна, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по науке Государственное учреждение «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»
Оппонирующая организация:	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Российская Федерация

Защита состоится 11 декабря 2026 года в 12.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.03 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220083, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83; e-mail: uchsovet@bsmu.by; телефон: (017) 302 16 21.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан 11 ноября 2026 года.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций Д 03.18.03,
кандидат медицинских наук, доцент  В.В. Савош

ВВЕДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения, от хронических заболеваний печени различной этиологии во всем мире в год умирает более 2 млн человек, в том числе около 1,32 млн от цирроза печени [Lin Y. et al., 2022; Borrello M. T., Mann D., 2023; Akkız H. et al., 2024].

На доклиническом этапе исследований сохраняется ряд нерешенных проблем, к которым относятся низкое качество и воспроизводимость экспериментальных моделей, отсутствие клеточных и молекулярно-генетических критериев стадии перехода фиброза в цирроз и полуколичественной шкалы для оценки фиброза и цирроза печени [Theise N. D., 2007; Friedman S. L., Pinzani M. 2022; Kolaric T. O. et al., 2023; Lee Y. S. Seki E., 2023].

Среди источников фиброгенных клеток интерес представляют стеллатные клетки и портальные фибробласты. Однако не до конца понятно, синтезируют ли портальные фибробласты фиброзную соединительную ткань или они выполняют другие роли в фиброгенезе [Wiering L. et al., 2023; Yan M. et al., 2023; Kim H. Y. et al., 2024]. Кроме того, остаётся не полностью изученным механизм влияния тканевых/резидентных макрофагов и инфильтрирующих моноцитов/макрофагов на исход фиброза и цирроза печени [Papachristoforou E., Ramachandran P., 2022; Gao C. C. et al., 2022].

Ключевое значение в фиброгенезе печени отводят компенсаторному ангиогенезу и капилляризации синусоидов на основании предположения, что эти морфологические процессы определяют его патогенез и исход болезни [Qu J. et al., 2024; Dumitru C. S., Raica M., 2024; Xue X. et al., 2024].

Достаточно поверхностно исследованы взаимодействия между уровнями мРНК генов *Notch1, Notch2, Yap1, Tweak, Fn14, Cxcl12, Mmp-9, Nos2* как сигнальных путей в развитии токсического фиброза печени, что не позволяет оценить потенциал их использования в качестве независимых маркеров фиброгенеза и мишени для антифибротических лекарственных средств [Zhang Y. et al., 2021; Rodriguez F. S. et al., 2023; Abubakr S. et al., 2023; Andrabi S. M. et al., 2023; Wang Y. et al., 2024].

Не полностью изучена роль микроРНК в активации стеллатных клеток, регуляции ангиогенеза, поляризации макрофагов посредством модуляции генов, а также в качестве маркеров для ранней диагностики и прогнозирования фиброгенеза [Abdel Halim A. S. et al., 2023; Ma C. et al., 2023; Gao R., Mao J. et al., 2024].

В связи с изложенным можно сделать заключение об актуальности данного направления исследований.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами

Тема диссертационного исследования соответствует приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь (Указ Президента Республики Беларусь «О приоритетных направлениях научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 годы» от 07.05.2020 г. № 156).

Диссертационная работа выполнялась в рамках государственного задания по программе научных исследований «Фундаментальные и прикладные науки – медицине», подпрограмме 2 «Диагностика и терапия заболеваний» (номер государственной регистрации 20190107 от 19.02.2019 г.) по теме «Изучить роль экспрессии генов NOTCH- и TWEAK-сигнальных путей, участвующих в процессах пролиферации и дифференцировки клеток печени в норме и при её токсическом поражении», а также в рамках гранта Президента Республики Беларусь (распоряжение Президента Республики Беларусь от 30 декабря 2022 года № 248рп «О предоставлении грантов Президента Республики Беларусь на 2023 год в сфере науки»).

Цель исследования – установить фенотипы клеточных популяций, паренхиматозных и стромальных компонентов печени, молекулярно-генетические механизмы экспериментального токсического фиброза и цирроза печени.

Задачи исследования:

1. Разработать полуколичественную шкалу для оценки фиброза и цирроза на этапе доклинических исследований и усовершенствовать экспериментальную модель токсического фиброза и цирроза печени.
2. Исследовать экспрессию иммуногистохимических маркеров паренхиматозных, стромальных, инфильтрирующих клеток на различных стадиях фиброза и цирроза печени и установить взаимосвязи между ними.
3. Изучить динамику уровней мРНК генов сигнальных путей Notch, TWEAK/Fn14, генов *Cxcl12, Mmp-9, Nos2* с выбором оптимальных референсных генов и выявить взаимосвязи между генами для их потенциального применения в качестве дополнительных критериев контроля прогрессирования фиброза и цирроза печени.
4. Оценить динамику уровней микроРНК, связанных с регуляцией экспрессии генов сигнальных путей Notch, TWEAK/Fn14, генов *Cxcl12, Mmp-9, Nos2* с определением молекулярных мишеней, отвечающих за развитие фиброза и цирроза печени.
5. Установить корреляционные связи между изучаемыми уровнями мРНК генов и их взаимосвязи с микроРНК в зависимости от стадий фиброза и

цирроза, изучить критерии, по которым допустимо использование молекулярно-генетических показателей для оценки прогрессирования фиброза печени, стадии перехода фиброза в цирроз.

6. Определить структурно-функциональные, молекулярно-генетические показатели компенсаторного ангиогенеза и морфологическую гетерогенность эндотелиальных клеток при фиброзе и циррозе печени.

7. Выявить гистологические и молекулярно-генетические критерии перехода стадии фиброза печени в цирроз, определить клеточные, паренхиматозные, стромальные, молекулярно-генетические параметры и разработать математическую модель для дифференцировки перехода стадии фиброза печени в цирроз.

Объект исследования: печень крыс-самцов *Wistar* в норме и при тиоацетамид-индуцированном фиброзе и циррозе.

Предмет исследования: гистологические, иммуногистохимические и морфометрические параметры сосудистого русла, фиброгенных клеток, эндотелиоцитов, различных популяций макрофагов, эпителиальных клеток желчных протоков, инфильтрирующих клеток, уровни мРНК генов и микроРНК в норме, на различных стадиях токсического экспериментального фиброза и цирроза печени.

Научная новизна

1. Разработана полуколичественная шкала, предназначенная для оценки динамики прогрессирования токсического фиброза и цирроза печени на доклиническом этапе исследований, а также усовершенствована экспериментальная модель токсического фиброза и цирроза печени.

2. Установлено, что на начальных стадиях токсического поражения печени клетки FAP^+ определяют формирование мостовидного фиброза, клетки $\alpha\text{-}SMA^+$ синтезируют соединительную ткань при очаговом перисинусоидном и перицеллюлярном фиброзе; получены новые данные об изменении фенотипического профиля, локализации, количестве резидентных и инфильтрирующих макрофагов в зависимости от стадии фиброза и цирроза; показаны две популяции клеток, экспрессирующих белок Fn14.

3. Выявлено, что рост уровня мРНК гена *Fn14* может выступать независимым фактором развития фиброза печени, снижение уровней мРНК генов *Notch1* и *Yap1* характеризует период перехода фиброза в цирроз, уровень мРНК гена *Cxcl12* является маркером фиброгенеза и определяет направленность процесса развития фиброза. Изменение уровня мРНК гена *Notch1* доказывает его участие в прогрессировании фиброза, а гена *Notch2* – в узловой перестройке паренхимы печени.

4. Показано участие микроРНК-19a-3p, микроРНК-29b-1-5p, микроРНК-125b-5p, микроРНК-130a-5p, микроРНК-195-5p, микроРНК-449c-5p, микроРНК-466d, микроРНК-495, микроРНК-489-3p, микроРНК-664-3p, микроРНК-3558-3p в развитии токсического фиброза и цирроза печени и продемонстрирована корреляционная связь между микроРНК и мРНК генов на различных этапах эксперимента.

5. Установлена взаимосвязь между уровнями мРНК генов *Cxcl12* и *Yap1* в норме и на всех стадиях фиброза и цирроза, прямая и обратные связи между микроРНК-3558-3p и геном *Cxcl12* на стадиях прогрессирующего фиброза и узловой перестройки паренхимы печени, рост уровня микроРНК-3558-3p и снижение уровня мРНК *Cxcl12.*

6. Определена морфологическая гетерогенность эндотелиальных клеток, участие уровней мРНК генов *Tweak, Notch1,* микроРНК-195-5p, микроРНК-664-3p, микроРНК-489-3p, микроРНК-3085, микроРНК-3558-3p в процессах перестройки внутрипечёночного сосудистого русла; получено нелинейное уравнение зависимости площади междольковых вен от стадий фиброза.

7. Выявлены молекулярно-генетические и морфологические критерии, характеризующие переход фиброза в цирроз как самостоятельный обособленный этап фиброгенеза. Разработана математическая модель дифференцировки перехода от стадии фиброза в стадию цирроза печени при использовании двух маркеров – количества клеток FAP^+ и уровня мРНК гена *Yap1*.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанная полуколичественная шкала для оценки токсического фиброза и цирроза печени на доклиническом этапе исследований с учетом промежуточных стадий на основе применения высоко воспроизводимой экспериментальной модели токсического фиброза и цирроза печени отражает стадийность морфологических проявлений, процесс узловой перестройки паренхимы, что позволяет изучать механизмы развития морфологических и молекулярно-генетических изменений в динамике развития фиброза и цирроза печени.

2. На начальных стадиях фиброза печени F1A/F1B–F3B/F4 клетки FAP^+ определяют морфогенетический вариант, по которому происходит направленный синтез фиброзной соединительной ткани в портальных трактах и формирование мостовидного фиброза; клетки α-SMA^+ синтезируют соединительную ткань при очаговом перисинусоидном и перицеллюлярном фиброзе. Выявлены две субпопуляции макрофагов $CD68^+$, отличающиеся морфофункциональными свойствами, локализацией в стромальном и паренхиматозном компонентах печени; среднее количество этих клеток

повышается до стадии перехода фиброза в цирроз F3B/F4. Среднее число макрофагов $CD206^+$ увеличивается до наступления полного цирроза на стадии F6, макрофагов $CX3CR1^+$ растёт на протяжении всего эксперимента. Клетки $CK19^+$ одновременно дифференцируются в холангиоциты и гепатоциты. В стенке синусоидных капилляров определяются клетки уплощённой формы, экспрессирующие белок Fn14, а в фиброзной ткани эти клетки имеют округлую форму. Наиболее значимые взаимосвязи между исследуемыми клетками установлены на стадии портального фиброза F1A/F1B, в начале узловой перестройки паренхимы на стадии фиброза F3B/F4 и на стадии полного цирроза F6.

3. Рост уровня мРНК гена *Fn14* до наступления стадии узловой перестройки паренхимы F3B/F4 является независимым фактором развития фиброза печени. Снижение уровня мРНК гена *Cxcl12* на стадиях фиброза печени F1A/F1B–F5A/F5B с максимальным его падением на стадии полного цирроза F6 и отсутствием изменений экспрессии *Cxcl12* при перестройке паренхимы выступает маркером фиброгенеза и определяет направленность развития фиброза. Уровень мРНК генов *Notch1* и *Yap1* на стадии узловой трансформации паренхимы F5A/F5B характеризует период перехода фиброза в цирроз печени. Установлены три фактора, объединяющие взаимосвязанные уровни мРНК изучаемых генов. Первый фактор включает гены *Cxcl12*, *Tweak*, *Notch1*, *Yap1*, участвующие в прогрессировании токсического фиброза печени. Второй фактор описывает корреляции между генами *Mmp-9* и *Notch2*, вовлекающиеся в узловую трансформацию паренхимы. В третий фактор входят гены *Ang* и *Vegfa*, задействованные в перестройке внутрипеченочного сосудистого русла.

4. Уровень изучаемых микроРНК по-разному включается в процессы токсического фиброза и цирроза печени. Установлено снижение микроРНК-195-5p, микроРНК-489-3p и микроРНК-664-3p и рост микроРНК-19a-3p, микроРНК-125b-5p, микроРНК-130a-5p, микроРНК-449c-5p, микроРНК-466d, микроРНК-495, микроРНК-3558-3p относительно контрольной точки. Уровень микроРНК-29b-1-5p характеризуется одновременно как падением, так и подъемом без выраженного однонаправленного вектора. Динамика уровня микроРНК-3085 не была статистически значимой ни на одной из стадий фиброза и цирроза печени, а уровень микроРНК-29b-3p и микроРНК-449a-5p увеличивается только на стадии полного цирроза F6.

5. Взаимосвязь между уровнями мРНК генов *Cxcl12* и *Yap1* в норме и на всех стадиях фиброза и цирроза, связь между микроРНК-3558-3p и мРНК гена *Cxcl12* на стадиях прогрессирующего фиброза и узловой перестройки паренхимы печени F1A/F1B–F5A/F5B, рост уровня микроРНК-3558-3p и снижение уровня мРНК *Cxcl12* определяют их совместное участие в миграции

клеток из красного костного мозга в печень. Отсутствие взаимосвязи между уровнями мРНК генов *Notch1* и *Notch2* при развитии токсического фиброза и цирроза печени, наличие связи между уровнями мРНК *Notch1* и *Tweak* до стадии узловой перестройки паренхимы F3B/F4, появление связи между уровнями мРНК *Notch2* и *Fn14* с наступлением стадии F3B/F4 и до конца эксперимента свидетельствуют о том, что молекулярные пути генов *Notch1*, *Notch2* сигнального пути Notch расходятся. Изменение уровней и взаимосвязей мРНК генов указывает на участие *Notch1* в прогрессировании фиброза, а гена *Notch2* – в узловой перестройке паренхимы печени.

6. Токсический фиброз и цирроз печени характеризуется венозным ангиогенезом, увеличением среднего количества и медианы площади междольковых вен, изменением соотношения между синусоидными капиллярами, междольковыми венами, междольковыми артериями, морфологической гетерогенностью эндотелиальных клеток, изменением медианы площади клеток $CD31^+$ и $CD34^+$, низким уровнем мРНК генов *Ang* и *Vegfa*, вовлечением генов *Tweak, Notch1*, микроРНК-195-5p, микроРНК-664-3p, микроРНК-489-3p, микроРНК-3085, микроРНК-3558-3p в процессы перестройки внутрипечёночного сосудистого русла. Нелинейное уравнение зависимости площади междольковых вен от стадий фиброза позволяет прогнозировать развитие стадий фиброза и цирроза печени.

7. Установленный переход фиброза печени в цирроз по молекулярно-генетическим и морфологическим показателям позволяет выделить этот этап в отдельную стадию фиброгенеза. Гистологически начало перехода зафиксировано на стадии F3B/F4. На начальной стадии перехода F3B/F4 уровни мРНК генов *Notch2*, *Mmp-9* и *Nos2* возрастают, при этом устанавливается максимальное количество корреляционных взаимосвязей между уровнями мРНК генов, микроРНК и мРНК генов без изменения клеточных популяций, паренхиматозных и стромальных компонентов. Разработанная математическая модель, основанная на значениях двух показателей (клетки FAP^+ и уровень мРНК *Yap1*), даёт возможность установить переход от стадии фиброза в стадию цирроза печени в доклинических исследованиях.

Личный вклад соискателя ученой степени

Личный вклад автора заключается в разработке и проведении экспериментов на животных, оптимизации протоколов методов ПЦР-РВ и иммуногистохимического исследования. Соискателем самостоятельно приготовлены гистологические препараты и осуществлён их морфометрический анализ. При описании гистологических препаратов автором разработана полуколичественная шкала для оценки токсического фиброза и цирроза печени на доклиническом этапе исследований. Автором

разработаны эффективный и быстрый методический подход как элемент оценки качества тест-систем, позволяющий определять уровни микроРНК в образцах биологического материала, а также математическая модель, дифференцирующая переход от стадии фиброза в стадию цирроза печени при использовании двух маркеров. Соискателем выполнена статистическая обработка данных, обобщение и анализ результатов работы в целом. Личный вклад автора в опубликованных научных работах составил более 90%.

Апробация результатов диссертации и информация об использовании ее результатов

Основные положения и результаты диссертации были доложены и обсуждены на международных научных и научно-практических конференциях, конгрессах, семинарах: «Актуальные вопросы морфологии» (Кишинёв, 2020), «Достижения современной морфологии – практической медицине и образованию» (Курск, 2021), «Июньские морфологические чтения» (Воронеж, 2021), «Достижения и проблемы фундаментальной науки и клинической медицины» (Душанбе, 2021), «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине» (Санкт-Петербург, 2021), «Клеточный цикл» (Лондон, 2022), «Современные аспекты морфологии, патоморфологии и онкопатологии организма человека» (Курск, 2022), VIII Российский конгресс лабораторной медицины (Москва, 2022), «Достижения морфологии: внедрение новых технологий в образовательный процесс и практическую медицину» (Минск, 2022), «Вопросы теоретической и прикладной морфологии» (Уфа, 2022), «Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии» (Гродно, 2022), «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической морфологии» (Тверь, 2022), «Современный взгляд на проблемы внутренней медицины» (Курск, 2022), «Актуальные проблемы инфекционной патологии животных и пути их решения» (Витебск, 2022), «Клеточный цикл» (Лондон, 2023), современный образовательный семинар «Методы исследования биотехнологических препаратов» (Витебск, 2023), «Актуальные проблемы медицинской науки и образования» (Пенза, 2023), «Современные тенденции в морфологии и репродуктивной медицине» (Тверь, 2024), «Морфология в XXI веке: теория, методология, практика» (Москва, 2024), «Анатомия в 21 веке – традиции и современность» (Санкт-Петербург, 2024), «Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации» (Витебск, 2025), «Актуальные проблемы и тенденции развития современной фундаментальной и прикладной морфологии» (Рязань, 2025).

Результаты освоения научного материала и оценка уровня исследований по гранту Президента Республики Беларусь в сфере науки были представлены на заседании Республиканской комиссии (Минск, 2024).

Материалы научных исследований отражены в 5 методических рекомендациях, утверждённых Национальной академией наук Беларуси; получены патент Республики Беларусь на полезную модель №13614 «Тест-система определения уровней экспрессии микроРНК при прогрессировании токсического фиброза печени» и уведомление о положительном результате предварительной экспертизы по заявке на выдачу патента Республики Беларусь на изобретение «Способ определения перехода стадии фиброза печени в стадию цирроза в эксперименте» № а 20240151.

Практическая значимость работы подтверждается 41 актом внедрения в практическое здравоохранение (9), лабораторно-диагностическую деятельность (1), научно-производственную деятельность (3), научно-практическую деятельность (1), научную деятельность (5) и образовательный процесс (22) Республики Беларусь и Российской Федерации, патентом Республики Беларусь на полезную модель №13614 «Тест-система определения уровней экспрессии микроРНК при прогрессировании токсического фиброза печени», уведомлением о положительном результате предварительной экспертизы по заявке на выдачу патента Республики Беларусь на изобретение «Способ определения перехода стадии фиброза печени в стадию цирроза в эксперименте» № а 20240151 и 5 методическими рекомендациями, утвержденными Национальной академией наук Беларуси.

Опубликование результатов диссертации

По теме диссертации опубликованы 73 научные работы, в том числе: монография (13,64 авт. л.); 27 статей (19,73 авт. л.), соответствующих п. 19 Положения о присуждении учёных степеней и присвоения ученых званий, из них 15 – в зарубежных журналах; 27 статей в сборниках по материалам конференций; 8 тезисов докладов; 5 статей в иных рецензируемых изданиях и 5 методических рекомендаций, утвержденных в Национальной академии наук Беларуси. Общий объём опубликованных материалов составляет 45,53 авт. л.

Структура и объем диссертации

Диссертация оформлена по стандартной схеме, изложена на 220 страницах, включает общую характеристику работы, 8 глав (литературный обзор, описание использованных материалов и методов, 6 глав по результатам исследований), заключение, практические рекомендации и список использованной литературы, в котором приводятся ссылки на 8 отечественных и 446 зарубежных источников (43 страницы). В работе имеется 105 рисунков (39 страниц), 20 таблиц (12 страниц), математическое уравнение и модель. Приложение оформлено отдельным томом и содержит 8 разделов.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материал и методы исследования

Экспериментальная часть. Условия содержания животных соблюдены и процедуры исследования выполнены в соответствии с Директивой 2010/63/EU и одобрены комитетом по биоэтике (протоколы № 6 от 03.01.2019 г., № 13 от 31.03.2022 г.). В эксперименте использовали крыс-самцов *Wistar*. К началу работы возраст животных составлял около 3-х месяцев и вес был равен от 190 до 210 г. Фиброз и цирроз печени у крыс индуцировали свежеприготовленным раствором тиоацетамида (ТАА, Acros Organics, Бельгия), который вводили интрагастрально через зонд в дозе 200 мг/кг массы тела два раза в неделю в течение 17 недель. Крысы контрольной группы (n = 12) получали воду без ТАА в аналогичном объеме. Животных разделили на 8 групп (n = 12 в каждой): 3 недели (1-я группа, стадия портального фиброза F1A/F1B), 5 недель (2-я группа, прогрессирующий фиброз F2A/F2B-F3A), 7 недель (3-я группа, прогрессирующий фиброз F2B-F3A/F3B), 9 недель (4-я группа, стадия узловой перестройки паренхимы F3B/F4), 11 недель (5-я группа, стадия узловой перестройки паренхимы F5A/F5B), 13 недель (6-я группа, неполный цирроз F5B/F6), 15 недель (7-я группа, полный цирроз F6), 17 недель (8-я группа, полный цирроз F6) и выводили из эксперимента согласно разделению на группы.

Гистологические, иммуногистохимические и морфометрические методы исследования. Для получения обзорных гистологических препаратов срезы печени окрашивали гематоксилином и эозином, а для выявления соединительной ткани – по методу Маллори и Ван-Гизона. Иммуногистохимическое исследование осуществляли на парафиновых срезах, применяли маркеры эндотелиальных клеток (CD31, каталожный номер E-AB-70173), мезенхимальных стволовых/эндотелиальных клеток (CD34, каталожный номер E-AB-60105), активированных стеллатных клеток (α-SMA, каталожный номер E-AB-22155), активированных портальных фибробластов (FAP, каталожный номер E-AB-32870), резидентных/тканевых макрофагов (CD68, каталожный номер E-AB-22013), функционального состояния тканевых макрофагов (CD206, каталожный номер E-AB-70178), макрофагов костномозгового происхождения (CX3CR1, каталожный номер E-AB-33382), цитокератин CK19 эпителиальных клеток (CK19, каталожный номер E-AB-70231), гемопоэтических клеток и зрелых лейкоцитов (CD45, каталожный номер E-AB-16319), белка Fn14 сигнального пути TWEAK/Fn14 (Fn14, каталожный номер NBP2-67729) производства Bio-Techne (США), Wuhan Elabscience Biotechnology Co., Ltd (Китай) [66–А, 67–А].

Гистологические препараты исследованы с использованием компьютерных программ ImageScope Color и cellSens Standard. Определена

площадь соединительной ткани и площадь экспрессии маркеров CD31, CD34, CK19, Fn14 в процентах к площади изображения без учёта степени экспрессии маркеров. Измерена площадь междольковых вен и междольковых артерий в мкм^2. Подсчитано количество клеток, экспрессирующих маркеры α-SMA, FAP, CD68, CD206, CX3CR1, CD45, междольковых артерий, междольковых вен и синусоидных капилляров. Все измерения осуществлены путём микрофотосъемки 10-и случайных неперекрывающихся полей зрения препаратов печени цифровой камерой OLYMPUS XC30 (Япония) на базе микроскопа OLYMPUS BX51 (Япония) при увеличении ×200, ×400.

Оценка уровня мРНК генов, формирование панели целевых микроРНК и определение их экспрессии методом ПЦР-РВ. Исследованы уровни мРНК генов *Tweak, Fn14* сигнального пути TWEAK/Fn14, генов *Notch1*, *Notch2* сигнального пути Notch, гена *Yap1* сигнального пути Hippo, гены *Cxcl12*, *Mmp-9, Nos2, Ang, Vegfa*. Уровень мРНК генов изучен в пуле вариантов (суммарная мРНК каждого из генов без разделения на альтернативные варианты сплайсинга). В качестве кандидатов в референсные гены использованы *Sdha, Hprt1, Prl3d1*.

Выделение суммарной РНК из образцов печени проведено с помощью набора реагентов «АртРНКMiniSpin» (АртБиоТех, Республика Беларусь). Контроль качественных характеристик образцов выполнен с помощью электрофореза в агарозном геле без денатурирующих условий. Концентрация суммарной РНК после выделения определена с помощью спектрофотометрии при длине волны 260 нм на приборе Specord 250 (Analytic Jena, Германия).

Синтез кДНК проведен с использованием олиго-dT праймеров и набора реагентов «ArtMMLV Total» (АртБиоТех, Республика Беларусь). Для одной реакции применяли одинаковое стартовое количество суммарной РНК – 200 нг/реакцию. При проведении ПЦР-РВ использованы реагенты производства компании «Праймтех» (Республика Беларусь) и прибор CFX96touch (BioRad, США). Эффективность реакций и абсолютное число копий, соответствующих мРНК, оценены методом стандартной кривой. Относительный уровень мРНК генов определён с помощью метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [65–A, 67–A].

Выбор целевых микроРНК (микроРНК-19a-3p, микроРНК-29b-3p, микроРНК-29b-1-5p, микроРНК-34b-5p, микроРНК-125b-5p, микроРНК-130a-5p, микроРНК-195-5p, микроРНК-449a-5p, микроРНК-449c-5p, микроРНК-466d, микроРНК-489-3p, микроРНК-495, микроРНК-664-3p, микроРНК-3085, микроРНК-3558-3p) осуществлён на основе информации в открытой онлайн-базе данных miRDB (https://mirdb.org/). Выделение микроРНК осуществлено с помощью набора NucleoSpin miRNA (Macherey-Nagel, Германия). Количество суммарной РНК после выделения определено с помощью спектрофотометрии на приборе Specord 250 (Analytic Jena, Германия, длина волны – 260 нм).

Синтез кДНК выполнен с использованием набора реагентов для обратной транскрипции «ArtMMLV Total» (АртБиоТех, Республика Беларусь). В реакционную смесь вносили 10 нг суммарной РНК. При проведении ПЦР-РВ использованы реагенты производства компании «Праймтех» и прибор CFX96touch (BioRad, США). Для определения уровня микроРНК применён способ, предложенный Androvic P. et al., 2017.

Статистическая обработка результатов. Результаты количественных измерений оценены с использованием программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc. США), IBM SPSS Statistics 23.0 (An IBM Company, 28.0.1, США), MedCalc 20 (MedCalc Software Ltd, Belgium), GraphPad Prism 9.4.1.681 (Software, Inc.) и электронных таблиц Microsoft Office Excel (Microsoft Corp., США). Нормальность распределения данных проведена с использованием критериев Шапиро-Уилка и Лиллиефорса. Применены описательные статистики, сравнение двух независимых выборок, ROC-анализ, коэффициент ранговой корреляции Спирмена, факторный анализ, логистическая регрессия. Критический уровень статистической значимости составил $p<0,05$. Расчет количества случаев, необходимых для включения в исследование, проведён в пакете статистической программы Statistica 10.0 в модуле анализ мощности.

Результаты собственных исследований

Экспериментальная модель токсического фиброза и цирроза печени, полуколичественная шкала оценки

В работе использовались интрагастральное и внутрибрюшинное введение ТАА крысам-самцам *Wistar*. Крыс разделили на контрольную и 16 опытных групп (по 12 особей в каждой). Первой экспериментальной группе крыс свежеприготовленный раствор ТАА вводили в желудок с помощью зонда (интрагастрально), а второй – внутрибрюшинно в дозе 200 мг/кг массы тела 2 раза в неделю в течение 17-и недель.

Интрагастральное введение ТАА характеризовалось низкой летальностью животных (погибло 9 крыс) и отражало стадийность морфологических проявлений фиброза и цирроза. По окончании 9-й недели эксперимента вблизи отдельных портальных триад происходила узловая трансформация паренхимы с образованием единичных ложных печёночных долек.

При внутрибрюшинном способе введения ТАА смертность составила 17 крыс. Начало процесса узловой перестройки паренхимы печени крыс наблюдали по завершении 11-й недели. Оценку специфичности и чувствительности двух экспериментальных моделей фиброза и цирроза печени осуществляли с помощью ROC-анализа. Значение площади под ROC-кривой в группах крыс с интрагастральным способом введения ТАА с 3-й по 11-ю недели эксперимента были выше (0,805; 0,861; 0,888; 0,974; 0,997;

p<0,001), чем в группах крыс с внутрибрюшинным (0,655; 0,733; 0,805; 0,893; 0,936; p<0,001). Показатели специфичности в группах крыс с интрагастральным способом введения ТАА с 3-й по 7-ю недели были равны 83,33%, на 9-й – 93,33%, а на последующих неделях – 100%. В группах крыс с использованием внутрибрюшинного способа введения специфичность 83,33% достигалась только на 9-й неделе эксперимента. Интрагастральное введение ТАА крысам позволило определить все стадии фиброза и разработать полуколичественную шкалу с учётом промежуточных стадий для оценки токсического фиброза и цирроза печени в доклинических исследованиях (таблица).

Таблица – Разработанная полуколичественная шкала для оценки токсического фиброза и цирроза печени в доклинических исследованиях

Стадия фиброза	Морфологическая характеристика выраженности стадии фиброза печени крыс при её токсическом поражении
F0	Фиброз отсутствует.
F1A	Портальный фиброз: минимальное фиброзное расширение части портальных трактов без соединительнотканных септ. Очаговый центролобулярный фиброз.
F1B	Портальный фиброз: минимальное фиброзное расширение части портальных трактов без образования септ и с наличием неполных тонких септ. Очаговый центролобулярный фиброз. Начало сближения портальных трактов.
F2A	Портальный фиброз: умеренное фиброзное расширение большинства портальных трактов без септ и с появлением неполных тонких септ, формирующихся у портальных трактов и реже вокруг центральных вен. Очаговый центролобулярный фиброз. Сближение портальных трактов.
F2B	Портальный фиброз: умеренное фиброзное расширение большинства портальных трактов без образования септ и с неполными септами, локализующимися у портальных трактов и реже вокруг центральных вен. Мостовидный фиброз (единичные полные септы). Очаговый центролобулярный, перицеллюлярный и перисинусоидный фиброз. Сближение портальных трактов.
F3A	Портальный фиброз: выраженное фиброзное расширение большинства портальных трактов с наличием не полностью сформированных септ разной толщины и длины, локализованных у портальных трактов и реже у центральных вен. Мостовидный фиброз. Разрастание соединительной ткани на местах некроза гепатоцитов. Диффузный перицеллюлярный и перисинусоидный фиброз. Сближение портальных трактов.

Продолжение таблицы

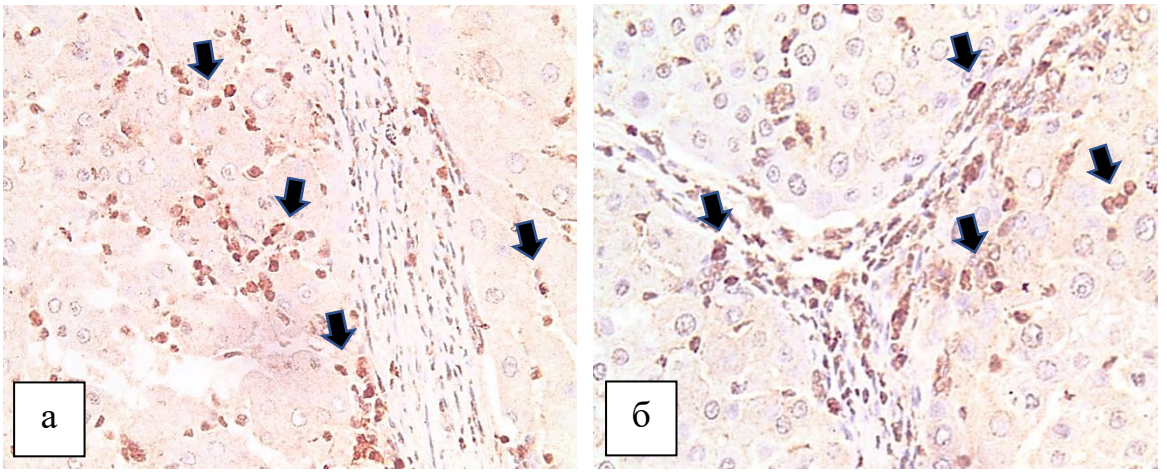
Стадия фиброза	Морфологическая характеристика выраженности стадии фиброза печени крыс при её токсическом поражении
F3B	Портальный и перипортальный фиброз: выраженное фиброзное расширение большинства портальных трактов с наличием неполных порто-портальных септ разной толщины с преобладанием толстых трабекул. Мостовидный фиброз. Разрастание соединительной ткани на местах некроза гепатоцитов. Перицеллюлярный и перисинусоидный фиброз. Сближение портальных трактов.
F4	Процесс трансформации фиброза печени в цирроз. Неполный цирроз: начало формирования единичных ложных печёночных долек рядом с портальными трактами. Выраженное фиброзное расширение всех портальных трактов (портальный и перипортальный фиброз) с полностью сформированными порто-портальными септами разной толщины (мостовидный фиброз). Перицеллюлярный и перисинусоидный фиброз.
F5A	Неполный цирроз: формирование ложных печёночных долек рядом с портальными трактами и наличие единичных ложных долек в паренхиме органа. Максимально выраженное фиброзное расширение всех портальных трактов (портальный и перипортальный фиброз), многочисленные порто-портальные соединительнотканные септы разной толщины. Перицеллюлярный и перисинусоидный фиброз.
F5B	Неполный цирроз: формирование ложных печёночных долек рядом с портальными зонами и в паренхиме органа (диффузная перестройка паренхимы). Многочисленные порто-портальные соединительнотканные септы разной толщины. Максимально выраженное фиброзное расширение всех портальных трактов (портальный и перипортальный фиброз). Перицеллюлярный и перисинусоидный фиброз.
F6	Полный цирроз: полная перестройка паренхимы, тотальное образование ложных печёночных долек разного диаметра и формы, выраженный диффузный портальный и перипортальный фиброз, диффузный перицеллюлярный и перисинусоидный фиброз.

Шкала проста в использовании, иллюстрирована микрофотографиями, сопровождается подробным морфологическим описанием стадий с указанием перехода от фиброза к циррозу.

Морфофункциональные показатели клеточных популяций в норме, на различных стадиях фиброза и цирроза печени

В течение всего эксперимента в печени крыс одновременно определялись две морфологически неоднородные популяции фиброгенных клеток. При прогрессирующем фиброзе печени на стадиях F1A/F1B–F5A/F5B клетки α-SMA$^+$ округлой формы преимущественно локализовались в стенке синусоидных капилляров и в очагах некроза гепатоцитов. Клетки FAP$^+$ округлой формы на стадии портального фиброза F1A/F1B располагались вокруг междольковых сосудов и вблизи желчных протоков портальных трактов. С наступлением стадии фиброза F2A/F2B-F3A происходило направленное разрастание грубоволокнистой соединительной ткани с обнаружением клеток FAP$^+$; септы начинались от двух противоположных портальных зон, росли навстречу друг к другу и полностью пронизывали дольку печени. Полученные результаты определяли морфогенетический вариант, по которому происходит синтез фиброзной соединительной ткани и формирование мостовидного фиброза. На стадии мостовидного, местами центролобулярного и диффузного перицеллюлярного, перисинусоидного фиброза F2A/F2B-F3A среднее количество клеток FAP$^+$ увеличилось в 1,70 раза ($p=0,021$), а клеток α-SMA$^+$ не изменилось ($p=0,3075$). В этот период значение площади под ROC-кривой 0,817 ($p<0,001$) и специфичности 97,22% для клеток FAP$^+$ свидетельствовали о том, что на начальном этапе фиброза клетки FAP$^+$ являются более чувствительным маркерам.

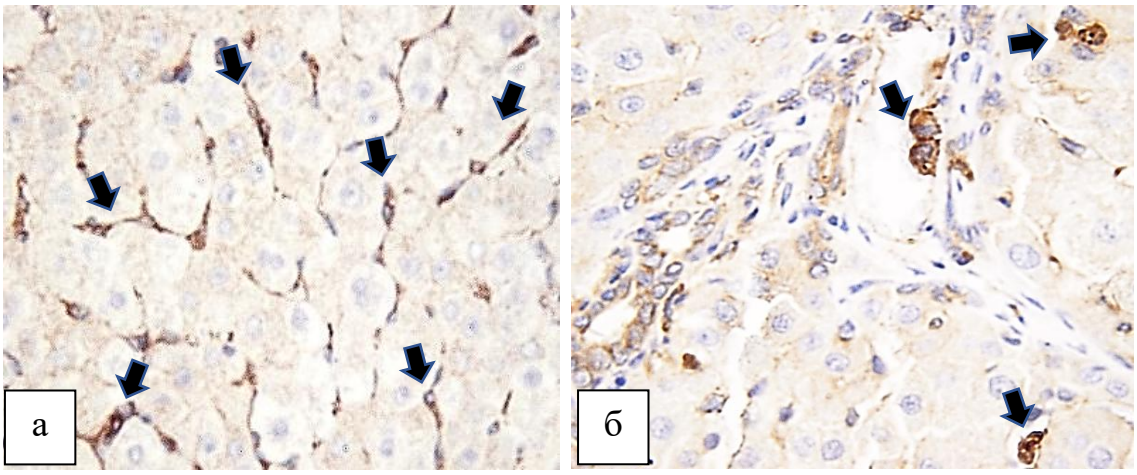
На стадиях фиброза и цирроза F5B/F6–F6 клетки α-SMA$^+$ и FAP$^+$ обнаруживались в синусоидных капиллярах, вокруг сосудов, вблизи желчных протоков портальных трактов и между волокнами соединительной ткани септ (рисунок 1). На стадии цирроза печени F6 количество клеток FAP$^+$, α-SMA$^+$ увеличилось в 5,40 раза ($p<0,001$) и 7,63 раза ($p<0,001$) соответственно.



Обозначения: а – клетки α-SMA$^+$ (стрелки), б – клетки FAP$^+$ (стрелки). Иммуногистохимическое окрашивание на α-SMA (а), на FAP (б), докраска гематоксилином Майера. Увеличение ×200 (а), ×400 (б).

Рисунок 1 – Гистологические препараты печени крыс на стадии фиброза F5B/F6

В норме в стенке синусоидных капилляров выявлялась популяция резидентных макрофагов отростчатой формы с маркером CD68. В течение исследования в печени определялись две субпопуляции клеток CD68+. Одна из них имела отростчатую форму и находилась преимущественно в стенке синусоидных капилляров. Чаще всего в синусоидах клетки $CD68^+$ располагались друг за другом, образуя тяжи из клеток, но реже формировали группы по две-три клетки, контактирующие друг с другом (рисунок 2, а).

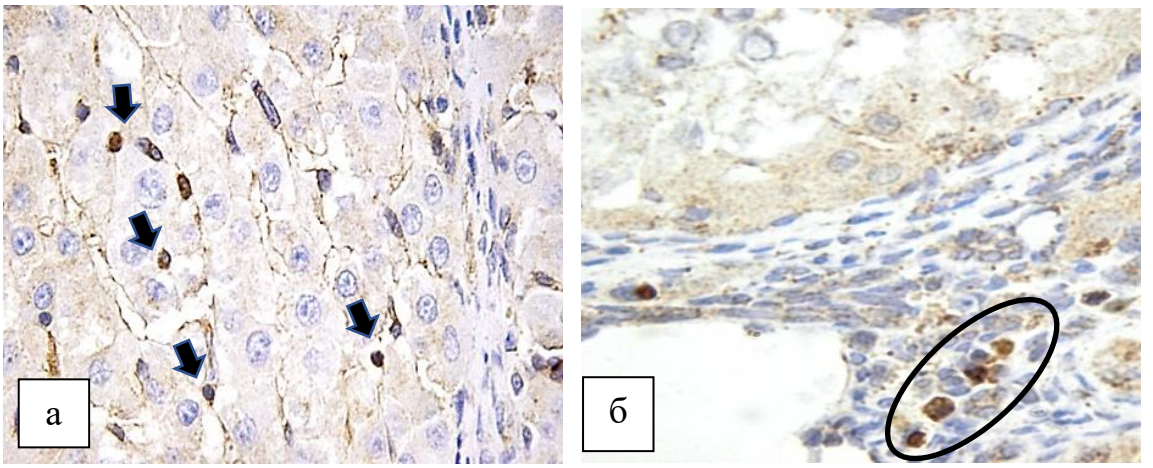


Обозначения: клетки $CD68^+$ отмечены стрелками. Иммуногистохимическое окрашивание на CD68, докраска гематоксилином Майера.
Увеличение ×400 (а), ×600 (б).

Рисунок 2 – Гистологические препараты печени крыс на стадиях фиброза F2A/F2B-F3A (а) и F5A/F5B (б)

Кроме того, клетки $CD68^+$ находились в составе грубоволокнистой соединительной ткани рядом с формирующимися желчными протоками. Изредка клетки $CD68^+$ отростчатой формы образовывали небольшие клеточные группы вблизи междольковых сосудов или залегали одиночно в фиброзных септах. Вторая субпопуляция клеток $CD68^+$ выделялась округлой и овальной формой и имела диффузную локализацию: вокруг кровеносных сосудов и междольковых желчных протоков портальных трактов, в очагах некроза гепатоцитов; местами клетки окружали скопления бурого пигмента в соединительной ткани (рисунок 2, б). Иногда клетки $CD68^+$ формировали группы вокруг одиночно лежащих гигантских гепатоцитов или их скоплений, содержащих в цитоплазме бурый пигмент, а также в стенке синусоидных капилляров. Среднее количество клеток $CD68^+$ повышалось в 2,15 раза ($p<0,001$) только до стадии перехода фиброза в цирроз F3B/F4.

На всех стадиях исследования клетки $CD206^+$ округло-вытянутой формы преимущественно выявлялись в стенке синусоидных капилляров (рисунок 3 а). В отдельных случаях они образовывали в них тяжи из клеток. На стадии фиброза F2A/F2B-F3A среднее количество клеток $CD206^+$ статистически значимо не изменялось. Примечательно, что до стадии фиброза F5A/F5B установлен их рост в 3,27 раза ($p<0,001$), а в последующем – их постепенное снижение.

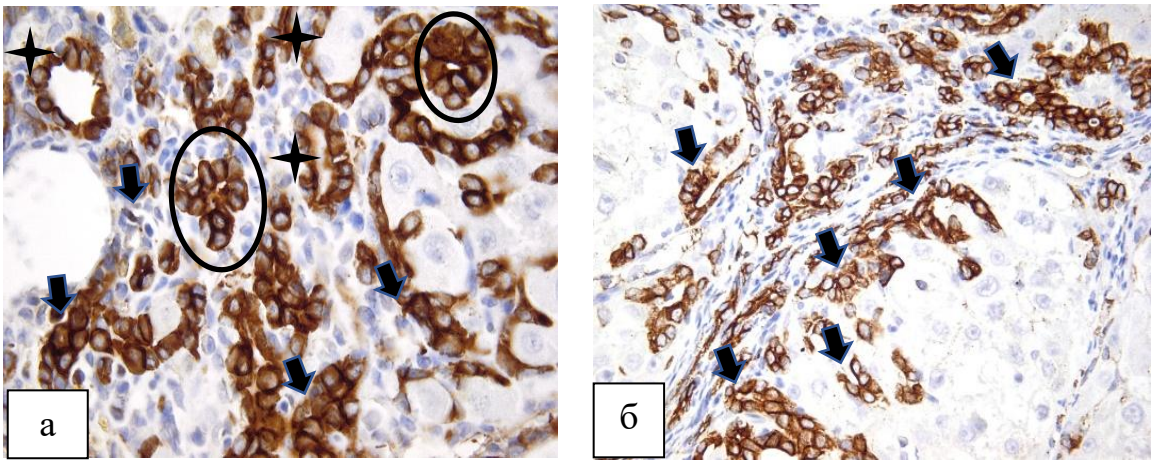


Обозначения: а – клетки $CD206^+$ (стрелки), б – клетки $CX3CR1^+$ (овальная рамка). Иммуногистохимическое окрашивание на CD206 (а), на CX3CR1 (б), докраска гематоксилином Майера. Увеличение ×600.

Рисунок 3 – Гистологические препараты печени крыс на стадии фиброза F2B-F3A/F3B

Клетки $CX3CR1^+$ имели округлую форму, тёмное гипербазофильное ядро и коричневую цитоплазму. До стадии фиброза F5A/F5B они локализовались главным образом в портальных трактах (рисунок 3, б). В дальнейшем клетки $CX3CR1^+$ обнаруживались в фиброзных септах и входили в состав тяжей из полиморфных клеток. Клетки $CX3CR1^+$ преимущественно выявлялись в виде групп от 4-х до 8-ми клеток и редко – поодиночке. В ряде случаев происходила миграция клеток $CX3CR1^+$ из просвета сосуда в паренхиму. Полный цирроз печени F6 сопровождался повышением медианы количества клеток $CX3CR1^+$ в 5,66 раза ($p<0,001$).

Определялись чёткие морфологические стадии формирования желчных протоков, представляющие собой округлые розеткообразные скопления клеток без просвета, структуры с намечающимся просветом и полностью сформированные протоки (рисунок 4, а).



Обозначения: а – группы клеток СК19$^+$ (стрелки), структуры из клеток СК19$^+$ с намечающимся просветом (овальные рамки), скопление клеток СК19$^+$ со сформированным просветом (звездочки); б – миграция клеток СК19$^+$ из фиброзной септы в центр ложной печёночной дольки (стрелки). Иммуногистохимическое окрашивание на СК19, докраска гематоксилином Майера. Увеличение ×400 (б), ×1000 (а).

Рисунок 4 – Гистологические препараты печени крыс на стадиях фиброза F2A/F2B-F3A (а), F5B/F6 (б)

На начальной стадии узловой перестройки паренхимы печени F3B/F4 вблизи триад одновременно развивались два процесса: узловая перестройка паренхимы печени с формированием единичных ложных печёночных долек и образование в соединительнотканных септах небольших структур, состоящих из скопления клеток СК19$^+$ морфологически сходных с гепатоцитами. Часто клетки СК19$^+$ наблюдались в середине формирующихся ложных печёночных долек (рисунок 4, б). На стадии полного цирроза печени F6 медиана площади клеток СК19$^+$ превышала контрольный показатель в 9,00 раз ($p<0,001$).

При фиброзе на стадиях F1A/F1B–F5A/F5B клетки CD45$^+$ определялись преимущественно в портальных трактах. На более поздних сроках эксперимента они располагались диффузно среди других клеток лимфоидно-гистиоцитарного инфильтрата портальных трактов и соединительнотканных септ. Первый пик роста среднего количества клеток CD45$^+$ происходил на начальной стадии узловой перестройки паренхимы F3B/F4 в 1,57 раза ($p<0,001$), а второй подъем показателя – на стадии полного цирроза F6 в 2,62 раза ($p<0,001$).

На стадиях фиброза F1A/F1B–F5B/F6 клетки Fn14$^+$ находились преимущественно в стенке синусоидных капилляров, по форме напоминая синусоидные эндотелиальные клетки. При полном циррозе обнаруживались две группы клеток Fn14$^+$ с разной локализацией и формой: в стенке синусоидных капилляров они имели форму близкую к плоской, схожую с

синусоидными эндотелиальными клетками, а в фиброзной ткани – округлую форму. Изменение медианы площади клеток $Fn14^+$ в 2,00 раза ($p<0,001$) отмечалось только на стадии фиброза F2A/F2B-F3A.

Факторный анализ показал, что в зависимости от стадии фиброза и цирроза печени исследуемые популяции клеток формируют группы факторов в различном сочетании. Наиболее значимые взаимосвязи между клетками выявляются на стадии портального фиброза F1A/F1B, в начале узловой перестройки паренхимы F3B/F4 и на стадии полного цирроза F6.

На стадии портального фиброза F1A/F1B коррелирующие клетки объединяются в пять групп факторов. Первый фактор включает клетки α-SMA^+, $CK19^+$, $CD31^+$, второй – клетки $CD206^+$, $CD31^+$, $CD45^+$, третий – клетки $Fn14^+$, $CX3CR1^+$, $CD31^+$ и четвёртый – клетки $Fn14^+$, $CD68^+$, $CD45^+$. В пятый фактор входят две популяции клеток $CD34^+$ и FAP^+. Значимыми корреляционными взаимосвязями отмечены клетки $CD34^+$ и FAP^+ ($r=0,442$, $p<0,05$), $CD68^+$ и $Fn14^+$ ($r=-0,334$, $p<0,05$), $Fn14^+$ и $CX3CR1^+$ ($r=0,394$, $p<0,05$), $CD45^+$ и α-SMA^+ ($r=-0,337$, $p<0,05$), $CD45^+$ и $CD206^+$ ($r=0,355$, $p<0,05$).

В начале узловой перестройки паренхимы печени F3B/F4 образуются четыре группы факторов. Первый фактор включает четыре типа клеток: $CD68^+$, $CX3CR1^+$, $CD34^+$ и $CD45^+$. Второй фактор объединяет три типа клеток: α-SMA^+, $CK19^+$ и $CD45^+$. В третий фактор входят клетки $CD206^+$, $CD31^+$, FAP^+, а в четвёртый – клетки $Fn14^+$ и FAP^+. Значимые корреляционные связи определяются между клетками $CK19^+$ и $CD206^+$ ($r=0,348$, $p<0,05$), FAP^+ и $CD206^+$ ($r=-0,368$, $p<0,05$).

На стадии цирроза печени F6 клетки образуют четыре группы факторов. Первый фактор включает четыре типа клеток: $CD45^+$, α-SMA^+, $CD34^+$ и $CD31^+$. Второй связывает две популяции клеток $CD68^+$ и FAP^+. В третий фактор входят клетки $CD206^+$, $CK19^+$, а в четвёртый – клетки $Fn14^+$ и $CX3CR1^+$. На стадии F6 значимые корреляционные связи выявлены между клетками α-SMA^+ и $CD34^+$ ($r=0,356$, $p<0,05$), $CD34^+$ и $CD31^+$ ($r=0,403$, $p<0,05$), α-SMA^+ и $Fn14^+$ ($r=0,411$, $p<0,05$), $CD34^+$ и $Fn14^+$ ($r=0,375$, $p<0,05$), $Fn14^+$ и $CX3CR1^+$ ($r=0,465$, $p<0,05$), $CD68^+$ и FAP^+ ($r=0,490$, $p<0,05$).

Стабильность экспрессии генов Sdha, Hprt, Prl3d1, Hes1 в рамках моделирования токсического фиброза печени крыс

При исследовании стабильности референсных генов отмечалось снижение уровня мРНК гена *Sdha* в 2,50 раза ($p<0,05$) на стадии фиброза F2A/F2B-F3A, рост уровня мРНК гена *Hprt* 2,50 раза ($p<0,05$) на стадии F1A/F1B с последующим падением в 3,00 раза ($p<0,05$) на стадии F2A/F2B-F3A и рост уровня мРНК *Prl3d1* ($p<0,05$) во все сроки исследования с максимальным его подъёмом в 5,00 раз ($p<0,05$) на стадии фиброза F5A/F5B.

Уровень мРНК гена *Hes1* относительно контрольной группы колебался в пределах погрешности эксперимента и на всех стадиях фиброза не отличался от стартового более чем в 2,00 раза. На основании данных о стандартном отклонении Cq только ген *Hes1* показал значение менее единицы. Для гена *Sdha1* показатель не превысил единицу. Пара генов *Hes1* и *Sdha1* может быть использована для нормализации данных ПЦР-РВ. Такой же результат был предоставлен и алгоритмами BestKeeper и NormFinder: пара *Hes1/Sdha*.

Динамика уровней изучаемых мРНК генов и микроРНК в зависимости от морфологических стадий развития фиброза и цирроза печени

На стадии портального и очагового центролобулярного фиброза F1A/F1B уровень мРНК гена *Fn14* при сравнении с контрольной точкой возрастает в 5,00 раз (p=0,029). Прогрессирование фиброза и начальный этап узловой перестройки паренхимы печени (стадии F2A/F2B-F3A–F3B/F4) практически не сопровождались изменением экспрессии мРНК *Fn14* при сравнении со стадией F1A/F1B. Уровень мРНК гена *Tweak* был снижен на всех стадиях фиброза и цирроза печени (p<0,001). При неполном циррозе (стадия F5B/F6) и полном циррозе (стадия F6) наблюдалось падение его уровня в 23,80 раза (p<0,001) в сравнении с контрольным показателем. Максимальное снижение уровней мРНК генов *Notch1* (5,58 раза, p<0,001) и *Yap1* (5,00 раз, p<0,001) происходило в период узловой перестройки паренхимы печени на стадии F5A/F5B.

На всех стадиях фиброза и цирроза печени уровень мРНК гена *Cxcl12* (p<0,001) в сравнении с контрольной точкой снижен. На стадии фиброза F5A/F5B уровень снижался в 18,00 раз (p<0,001). При перестройке паренхимы печени и формировании ложных печёночных долек экспрессия мРНК *Cxcl12* практически сохранялась на одном уровне. На стадии цирроза F6 его уровень падал в 25,69 раза (p<0,001). Рост уровней мРНК генов *Notch2* (1,60 раза, p<0,001), *Mmp-9* (1,84 раза, p<0,001) и *Nos2* (1,69 раза, p<0,05) выявлен только на начальном этапе узловой перестройки паренхимы печени (стадия F3B/F4).

Динамика уровня микроРНК-3085 не была статистически значимой ни на одной из стадий фиброза и цирроза печени (p>0,05), а экспрессия микроРНК-29b-3p (1,62 раза, p<0,001) и микроРНК-449a-5p (33,40 раза, p<0,001) увеличивалась только на стадии полного цирроза F6. Отмечено снижение уровней микроРНК-195-5p (8,75 раза, p<0,001), микроРНК-489-3p (2,09 раза, p<0,001) и микроРНК-664-3p (1,86 раза, p<0,001). Уровни микроРНК-19a-3p (1,53 раза, p<0,001), микроРНК-125b-5p (1,41 раза, p<0,001), микроРНК-130a-5p (1,56 раза, p<0,001), микроРНК-449c-5p (1,50 раза, p<0,001), микроРНК-466d (1,77 раза, p<0,001), микроРНК-495 (2,00 раза, p<0,001), микроРНК-3558-3p (2,00 раза, p<0,001) показали рост относительно

контрольной точки. Уровень микроРНК-29b-1-5p характеризовался как снижением в 1,50 раза ($p<0,001$), так и ростом в 1,50 раза ($p<0,001$) без выраженного однонаправленного вектора на протяжении всех стадий фиброза и цирроза.

Связь между молекулярно-генетическими показателями в норме, на различных стадиях фиброза и цирроза печени

Факторный анализ показал наличие трёх факторов, объединяющих исследуемые гены с высокой корреляционной связью (рисунок 5). Первый фактор включал уровни мРНК четырех генов: *Cxcl12* ($r=0,829$, $p<0,05$), *Tweak* ($r=0,841$, $p<0,05$), *Notch1* ($r=0,848$, $p<0,05$), *Yap1* ($r=0,921$, $p<0,05$). Второй фактор описывал корреляции между уровнями мРНК генов *Mmp-9* ($r=0,791$, $p<0,05$), *Notch2* ($r=0,836$, $p<0,05$). В третий фактор вошли уровни мРНК генов *Ang* ($r=0,748$, $p<0,05$) и *Vegfa* ($r=0,679$, $p<0,05$). Гены *Nos2* и *Fn14* не вошли ни в один из факторов.

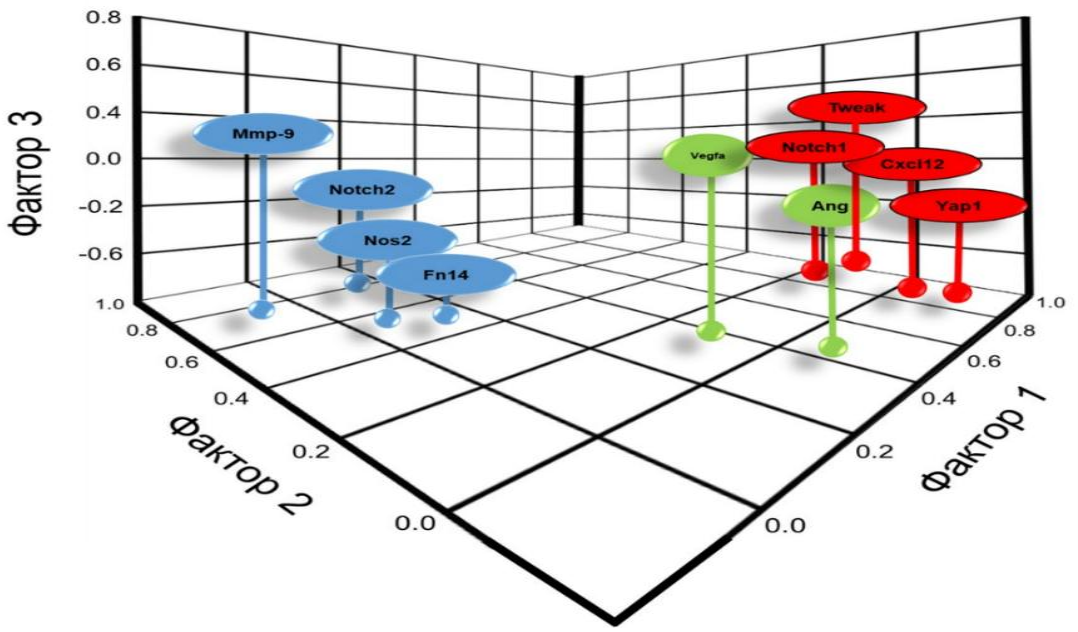


Рисунок 5 – График извлечённых факторов в трёхмерных координатах

Анализ корреляционных связей показал, что наличие и сила взаимосвязей между уровнями мРНК генов, микроРНК и мРНК генов зависят от стадии фиброза и цирроза печени. Уровни мРНК генов *Notch1* и *Notch2* сигнального пути Notch взаимосвязаны в норме ($r=0,417$, $p<0,05$) и на начальной стадии узловой перестройки паренхимы печени F3B/F4 ($r=0,378$, $p<0,05$). Связь между уровнями генов *Tweak* и *Fn14* сигнального пути TWEAK/Fn14 в норме не определялась, но обнаруживалась только при прогрессирующем фиброзе печени (стадия F2A/F2B-F3A – $r=0,685$ и стадия F2B-F3A/F3B – $r=0,582$, $p<0,01$). В норме и до начальной стадии узловой перестройки паренхимы F3B/F4 установлена взаимосвязь между уровнями

мРНК генов *Notch1* и *Tweak* (r=0,391-0,711, p<0,05), а со стадии F3B/F4 и до конца эксперимента на стадии цирроза F6 выявлена связь уровней мРНК генов *Notch2* и *Fn14* (r=0,383-0,675, p<0,05).

Уровень мРНК гена *Yap1* коррелировал с генами *Notch1* (r=0,457-0,761, p<0,01) и *Notch2* (r=0,366-0,488, p<0,05) на различных стадиях фиброза и цирроза печени. В норме и практически на всех этапах эксперимента проявляется корреляционная связь между уровнями генов *Yap1* и *Tweak* (r=0,382-0,810, p<0,05). При прогрессирующем фиброзе печени стадии F2A/F2B-F3A–F3B/F4 и циррозе F6 уровень мРНК гена *Yap1* взаимосвязан с геном *Fn14* (r=0,353-0,511, p<0,05).

На отдельных стадиях фиброза и цирроза печени реализуется наибольшее количество прямых и обратных взаимосвязей между уровнями мРНК генов *Notch2*, *Tweak*, *Fn14*, *Yap1* и микроРНК-195-5p (r=0,352-0,603, p<0,05), микроРНК-489-3p (r=0,330-0,578, p<0,05), микроРНК-664-3p (r=0,346-0,662, p<0,05), микроРНК-3558-3p (r=0,330-0,603, p<0,05). Исследуемые микроРНК практически не коррелировали с уровнем мРНК гена *Notch1*.

Уровень мРНК *Cxcl12* в норме и на всех стадиях фиброза и цирроза печени взаимосвязан с уровнем мРНК *Yap1* (r=0,368-0,864, p<0,05). В условиях нормы и на отдельных стадиях фиброза и цирроза печени уровень мРНК гена *Cxcl12* связан с уровнями мРНК генов *Notch1* (r=0,346-0,839, p<0,05), *Notch2* (r=0,364-0,625, p<0,05), *Fn14* (r=0,354-0,484, p<0,05), *Tweak* (r=0,436-0,826, p<0,01). Между уровнями микроРНК-3558-3p и мРНК *Cxcl12* на стадиях прогрессирующего фиброза и узловой перестройки паренхимы печени F1A/F1B–F5A/F6 прослеживались прямые и обратные связи (r=0,350-0,548, p<0,05). МикроРНК-29b-3p (r=-0,305-0,606, p<0,05), микроРНК-195-5p (r=0,373-0,510, p<0,05), микроРНК-449a-5p (r=0,501-0,596, p<0,05), микроРНК-449c-5p (r=0,476-0,517, p<0,05), микроРНК-466d (r=-0,347-0,391, p<0,05), микроРНК-664-3p (r=0,426-0,498, p<0,05) коррелировали с уровнем мРНК *Cxcl12* на отдельных стадиях фиброза и цирроза печени.

В условиях нормы и на протяжении всего эксперимента уровни мРНК генов *Mmp-9* и *Nos2* взаимосвязаны (r=0,356-0,769, p<0,05). С уровнем *Notch1* ген *Mmp-9* связан (r=0,403-0,779, p<0,05) на стадиях прогрессирующего цирроза и узловой перестройки паренхимы печени F2A/F2B-F3A–F5A/F5B, а с уровнем *Notch2* – в норме и практически на всех этапах эксперимента (r=0,373-0,861, p<0,05). Уровень мРНК генов *Tweak* и *Fn14* коррелировал с уровнем *Mmp-9* в норме (r=0,418, r=0,367, p<0,05) и на различных стадиях фиброза и цирроза (r=0,406-0,426, r=0,367-0,705, p<0,05 соответственно). Наименьшее количество связей определялось между генами *Mmp-9* и *Yap1*.

Уровень гена *Nos2* коррелировал с генами *Notch1* (r=0,418-0,820, p<0,05) и *Tweak* (r=0,354-0,381, p<0,05) только на стадиях F2A/F2B-F3A–F3B/F4, а с геном *Notch2* – в норме и практически на всех этапах эксперимента (r=0,418-0,823, p<0,05). В период трансформации фиброза в цирроз и на стадии полного цирроза F6 ген *Nos2* связан с геном *Fn14* (r=0,523-0,594, p<0,01). С уровнем мРНК *Yap1* ген *Nos2* взаимосвязан на стадиях прогрессирующего фиброза F1A/F1B–F3B/F4 и цирроза F6 (r=0,331-0,456, p<0,05).

Прямые и обратные корреляционные связи между уровнями мРНК генов *Nos2*, *Mmp-9* и микроРНК-19a-3p (r=0,388-0,496, p<0,05), микроРНК-29b-3p (r=0,399-0,656, p<0,05), микроРНК-195-5p (r=0,329-0,478, p<0,05), микроРНК-466d (r=0,337-0,439, p<0,05), микроРНК-489-3p (r=0,333-0,557, p<0,05), микроРНК-495 (r=0,342-0,558, p<0,05), микроРНК-664-3p (r=0,355-0,766, p<0,05), микроРНК-3558-3p (r=0,381-0,511, p<0,05) определялись в норме и на отдельных стадиях фиброза и цирроза печени.

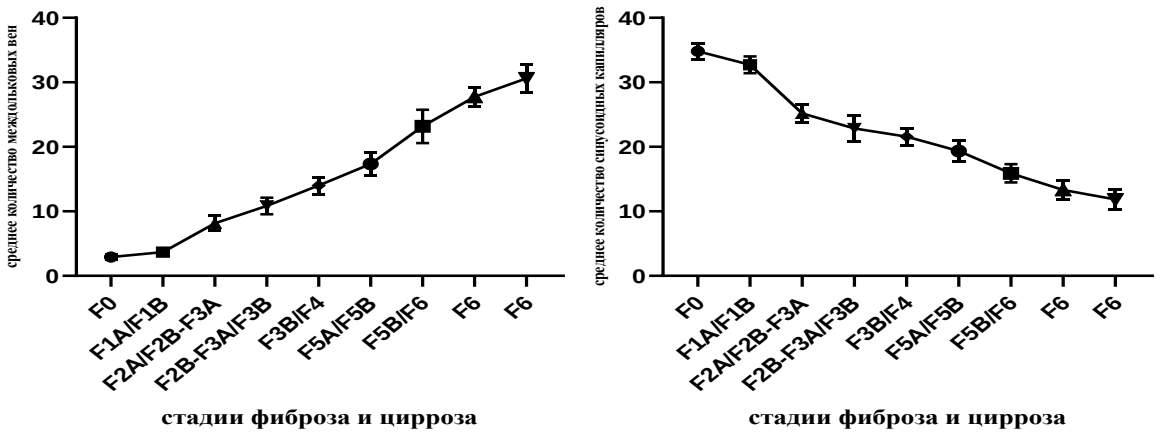
Состояние сосудистого русла печени в норме, при фиброзе и циррозе

Венозный ангиогенез в печени крыс проявлялся формированием венул и мелких вен. Одновременно с этим процессом происходило увеличение медианы площади междольковых вен (в 72,00 раза, p<0,001 на стадии цирроза F6). Зависимость площади междольковых вен от стадий фиброза и цирроза описывается математическим нелинейным уравнением:
$У=0,6932*X^6-31,067*X^5+527,33*X^4-4123,5*X^3+14728*X^2-18413*X+4478$, где X – площадь междольковых вен.

Значение коэффициента множественной детерминации $R^2=0,998$.

На стадии цирроза F6 среднее количество междольковых вен увеличивается в 10,50 раза (p<0,001, рисунок 6, а), а коэффициент соотношения между средним количеством междольковых вен и междольковых артерий – до 14,00 (p<0,001).

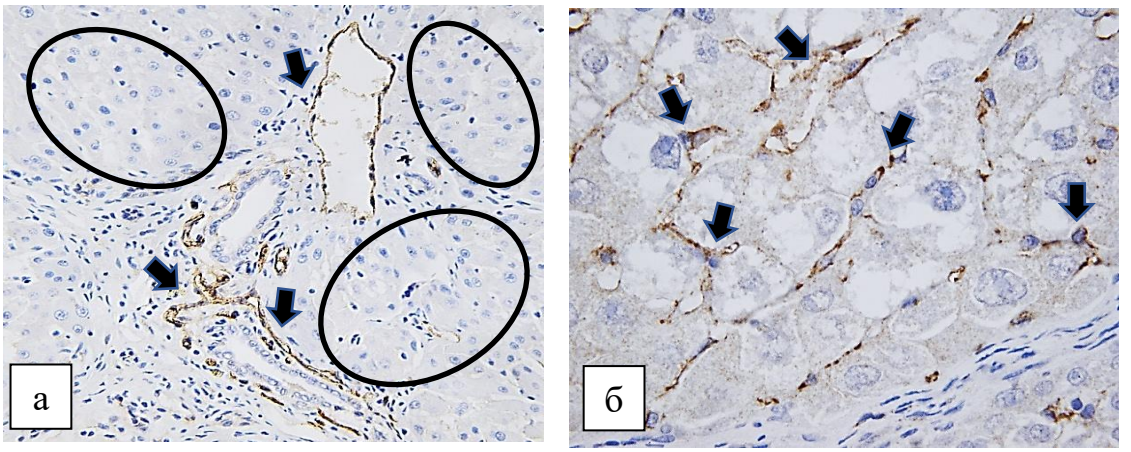
Снижается среднее количество синусоидных капилляров в 3,00 раза (p<0,001, рисунок 6, б) и падают коэффициенты соотношения между средним количеством синусоидных капилляров и междольковых вен до 0,40 (p<0,001), между средним количеством синусоидных капилляров и междольковых артерий до 5,40 (p<0,001).



а б

Рисунок 6 – Динамика среднего количества междольковых вен (а) и среднего количества синусоидных капилляров (б) на различных стадиях фиброза и цирроза печени

Морфологическая гетерогенность эндотелиальных клеток проявлялась: экспрессией маркеров CD34 и CD31 в стенке междольковых артерий, междольковых, центральных и собирательных вен в контрольной и опытной группах крыс; отсутствием экспрессии маркера CD34 синусоидными эндотелиальными клетками в условиях нормы и до стадии узловой перестройки паренхимы печени (рисунок 7); в норме в центролобулярной и перипортальной зонах визуализировались клетки $CD31^+$, тогда как в промежуточной зоне в отдельных местах наблюдалось полное отсутствие иммуногистохимической реакции.



Обозначения: а – отсутствие экспрессии маркера CD34 в синусоидных капиллярах (овальные рамки), клетки $CD34^+$ в сосудах фиброзных септ (стрелки), б – клетки $CD34^+$ в синусоидных капиллярах (стрелки). Иммуногистохимическое окрашивание на CD34, докраска гематоксилином Майера. Увеличение ×200 (а), ×1000 (б).

Рисунок 7 – Гистологические препараты печени крыс на стадии фиброза F2A/F2B-F3A (а), полного цирроза F6 (б)

Медиана площади клеток $CD31^+$ превышала контрольный показатель на всех этапах эксперимента, а на стадии полного цирроза F6 она увеличилась в 7,00 раз ($p<0,001$). Медиана площади, приходящаяся на клетки $CD34^+$, увеличилась в 2,00 раза ($p<0,001$), начиная со стадии фиброза F5B/F6 в сравнении с контрольным показателем.

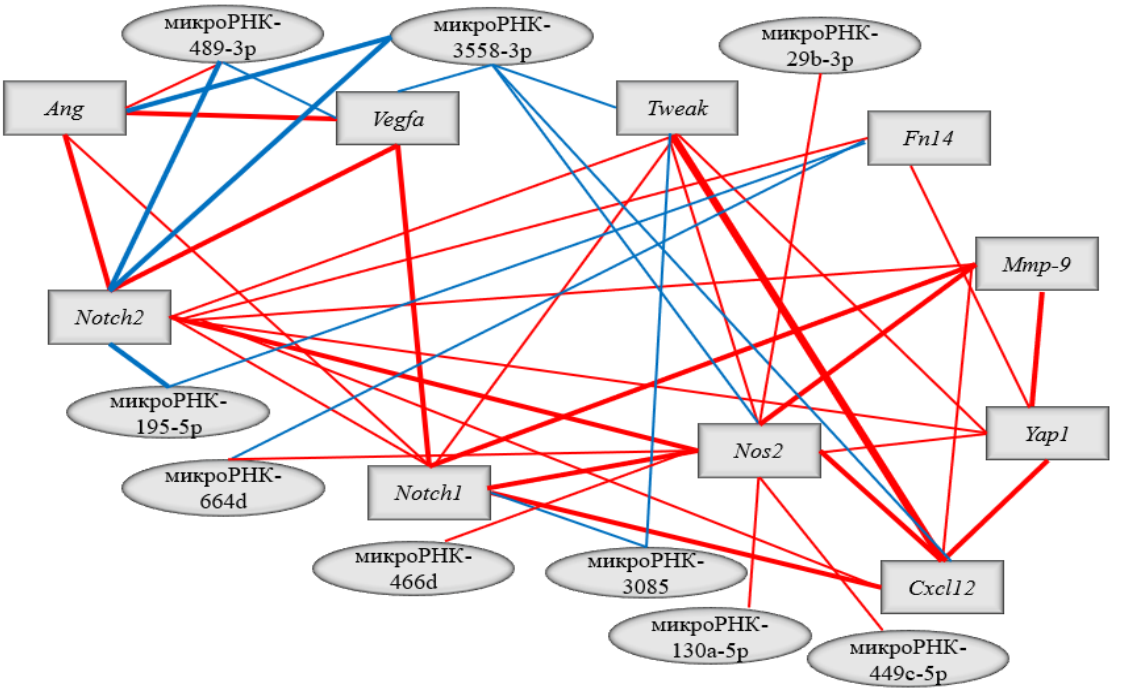
Отмечалось снижение уровней мРНК генов *Ang* в 53,80 раза ($p<0,001$), *Vegfa* – в 5,27 раза ($p<0,001$) относительно контрольной точки и взаимосвязи между ними в норме ($r=0,731$, $p<0,01$), а также при прогрессирующем фиброзе печени стадии F1A/F1B–F3B/F4 и циррозе F6 (прямые и обратные $r=0,463$-$0,725$, $p<0,01$). Установлены связи между уровнями мРНК генов *Ang* и *Notch1* ($r=0,409$-$0,817$, $p<0,05$), *Ang* и *Tweak* ($r=0,342$-$0,702$, $p<0,05$), *Vegfa* и *Notch1* ($r=0,356$-$0,649$, $p<0,05$), *Vegfa* и *Tweak* ($r=0,396$-$0,655$, $p<0,05$).

В условиях нормы между всеми исследуемыми микроРНК отсутствовала статистически значимая корреляция с уровнями мРНК генов *Ang* и *Vegfa*. На отдельных стадиях фиброза и цирроза печени проявлялись прямые и обратные связи между уровнями мРНК генов *Ang*, *Vegfa* и микроРНК-195-5p ($r=0,462$-$0,593$, $p<0,05$), микроРНК-664-3p ($r=0,334$-$0,730$, $p<0,05$), микроРНК-489-3p ($r=0,384$-$0,550$, $p<0,05$), микроРНК-3085 ($r=0,492$-$0,504$, $p<0,05$), микроРНК-3558-3p ($r=0,358$-$0,562$, $p<0,05$).

Морфологические и молекулярно-генетические критерии стадии перехода фиброза печени в цирроз

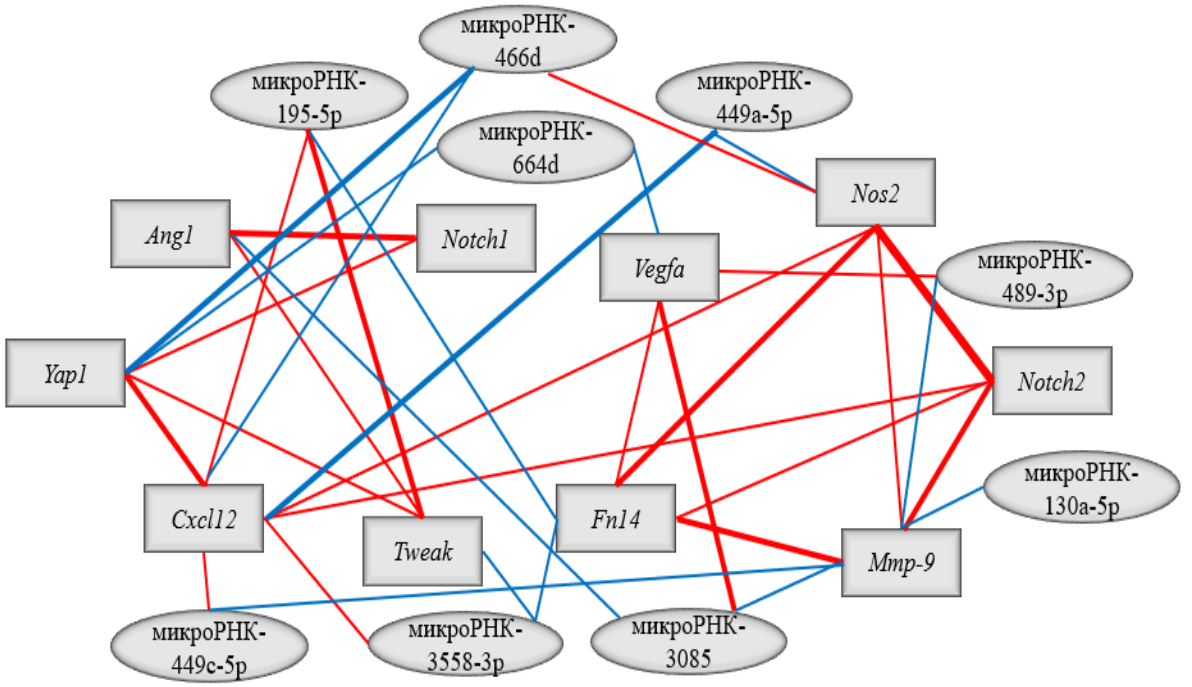
На начальной стадии узловой перестройки паренхимы печени F3B/F4 замедлялся рост медианы площади соединительной ткани ($p=0,791$), сохранялись среднее количество ($p=0,307$) и медиана площади междольковых вен ($p=0,999$), а также не снижалось среднее количество синусоидных капилляров ($p=0,798$). Среднее количество клеток α-SMA^+ ($p=0,207$) и FAP^+ ($p=0,377$) оставалось на прежнем уровне, не было отличий по медианам площади клеток $CK19^+$ ($p=0,993$), $Fn14^+$ ($p=0,113$), $CD31^+$ ($p=0,783$), $CD34^+$ ($p=0,617$). Отсутствовали различия по показателям клеток, экспрессирующих маркеры CX3CR1 ($p=0,998$), $CD206^+$ ($p=0,641$) и CD45 ($p=0,999$). Выявлен рост уровней мРНК генов *Notch2* ($p<0,001$), *Mmp-9* ($p<0,001$) и *Nos2* ($p<0,05$).

Данный период отмечен наибольшим количеством прямых и обратных корреляционных связей между уровнями мРНК генов ($r=0,354$-$0,803$, $p<0,005$), а также уровнями микроРНК и мРНК генов ($r=0,330$-$0,603$, $p<0,005$, рисунок 8). МикроРНК-3558-3p формировала большое число обратных связей с генами ($r=-0,330$-$0,603$, $p<0,005$). На стадии неполного цирроза F5B/F6 многие корреляционные связи разрывались и ослабевали (рисунок 9).



Обозначения: линия красного цвета – прямая корреляционная связь;
линия синего цвета – обратная корреляционная связь.

Рисунок 8 – Корреляционные связи между показателями уровней мРНК генов и их взаимосвязи с уровнями микроРНК на стадии фиброза F3B/F4



Обозначения: линия красного цвета – прямая корреляционная связь;
линия синего цвета – обратная корреляционная связь.

Рисунок 9 – Корреляционные связи между показателями уровней мРНК генов и их взаимосвязи с уровнями микроРНК на стадии фиброза F5B/F6

Полученные результаты позволяют установить переход фиброза в цирроз и выделить в обособленный этап фиброгенеза. Морфологически начало перехода было определено на стадии фиброза F3B/F4, а процесс длился, начиная со стадии F3B/F4, и включительно по стадию F5B/F6.

Разработанная математическая модель даёт возможность выявить стадию перехода фиброза в цирроз печени на этапе доклинических исследований. При морфологическом исследовании отмечается количество клеток, экспрессирующих белок активации фибробластов FAP; методом ПЦР-РВ определяется уровень экспрессии мРНК гена *Yap1*, по формуле рассчитывается стадия фиброзных изменений печени.

Итоговая модель имеет следующий вид: $P=1/(1+EXP(0{,}73-0{,}25*X_1+20{,}86*X_2))$, где X_1 – клетки FAP^+, X_2 – мРНК *Yap1*.

При значениях $P<0{,}5$ определяется стадия фиброза, при значении $P=0{,}5$ устанавливается стадия перехода фиброза печени в цирроз, при значениях $0{,}5<P\leq1$ выявляется наличие полного цирроза. Разработанная модель характеризуется чувствительностью 77,78 (95% ДИ [52,4–93,6]) и специфичностью 72,22 (95% ДИ [46,5–90,3]) при уровне значимости $p=0{,}0007$. Для оценки качества полученной математической модели использовался ROC-анализ. Площадь под ROC-кривой составила 0,883; ст. ошибка – 0,056 (95% ДИ [0,732–0,966]).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Разработана полуколичественная шкала для оценки токсического фиброза и цирроза печени на доклиническом этапе исследований с учётом промежуточных стадий. Усовершенствована экспериментальная модель токсического фиброза и цирроза печени у крыс-самцов *Wistar* с интрагастральным способом введения ТАА. Этот способ введения обеспечивает высокую воспроизводимость фиброза и цирроза печени, низкую летальность животных, отражает стадийность морфологических проявлений и процесс узловой перестройки паренхимы. При интрагастральном способе введения ТАА значение площади под ROC-кривой в группах крыс на 3-й, 5-й, 7-й, 9-й, 11-й неделях эксперимента выше (0,805; 0,861; 0,888; 0,974; 0,997; $p<0{,}001$), чем в группах крыс с внутрибрюшинным способом введения ТАА (0,655; 0,733; 0,805; 0,893; 0,936; $p<0{,}001$). Показатели специфичности при использовании интрагастрального способа введения ТАА с 3-й по 7-ю недели составили 83,33%, на 9-й – 93,33%, а с 11-й по17-ю недели – 100%. В группах крыс с внутрибрюшинным способом ТАА введения специфичность достигла

83,33% лишь на 9-й неделе эксперимента [1–А, 4–А, 7–А, 41–А, 45–А, 49–А, 58–А, 64–А, 68–А].

2. При прогрессирующем фиброзе печени на стадиях F1A/F1B–F3B/F4 клетки FAP^+ определяется морфогенетический вариант, направленность синтеза соединительной ткани в портальных трактах и формирование мостовидного фиброза. До наступления стадии узловой перестройки паренхимы F3B/F4 клетки $\alpha\text{-}SMA^+$ локализуются в стенке синусоидных капилляров, в очагах некроза гепатоцитов, синтезируя соединительную ткань при очаговом перисинусоидном и перицеллюлярном фиброзе. Позднее клетки $\alpha\text{-}SMA^+$ выявляются в портальных трактах и фиброзных септах. На стадии мостовидного, местами центролобулярного и диффузного перицеллюлярного, перисинусоидного фиброза F2A/F2B-F3A среднее количество клеток FAP^+ увеличивается в 1,70 раза ($p=0,021$), а клеток $\alpha\text{-}SMA^+$ не изменяется ($p=0,3075$). В этот период значение площади под ROC-кривой 0,817 ($p<0,001$) и специфичности 97,22% для клеток FAP^+ свидетельствуют о том, что клетки FAP^+ являются более чувствительным маркером. Одна субпопуляция резидентных макрофагов $CD68^+$ округлой и овальной формы выполняет фагоцитарную функцию, локализуется в стромальном и паренхиматозном компонентах печени. Вторая субпопуляция макрофагов $CD68^+$ отростчатой формы находится в стенке синусоидных капилляров. Среднее количество макрофагов $CD68^+$ повышается в 2,15 раза ($p<0,001$) до начала стадии перехода фиброза в цирроз F3B/F4. Макрофаги $CD206^+$ округло-вытянутой формы выявляются преимущественно в стенке синусоидных капилляров, среднее количество которых увеличивается в 3,27 раза ($p<0,001$) до наступления полного цирроза F6. Макрофаги $CX3CR1^+$ округлой формы локализуются в портальных трактах и в фиброзных септах. На стадии полного цирроза F6 установлен максимальный рост медианы их количества в 5,66 раза ($p<0,001$). Клетки $CK19^+$ дифференцированы по двум направлениям: в холангиоциты и в гепатоциты. Медиана их площади превышает контрольный показатель в 9,00 раз ($p<0,001$). В стенке синусоидных капилляров определяются клетки $Fn14^+$ уплощённой формы, а в фиброзной ткани они имеют округлую форму. Изменение медианы площади клеток $Fn14^+$ в 2,00 раза ($p<0,001$) определено только на стадии фиброза F2A/F2B-F3A [1–А, 5–А, 13–А, 18–А, 20–А, 22–А, 27–А, 36–А, 37–А, 38–А, 40–А, 44–А, 46–А, 47–А, 55–А, 57–А, 59–А, 63–А, 66–А, 67–А, 72–А].

Установлено, что в зависимости от стадии фиброза и цирроза печени исследованные популяции клеток формируют группы факторов в различном сочетании, что указывает на смену фенотипа клеток, участвующих в данных патологических процессах. Наиболее значимые взаимосвязи между клетками выявлены на стадии портального фиброза F1A/F1B, в начале узловой

перестройки паренхимы на стадии фиброза F3B/F4 и на стадии полного цирроза F6. На стадиях фиброза F1A/F1B и F3B/F4 клетки α-SMA$^+$ и CK19$^+$ объединяются в один фактор, что свидетельствует об участии клеток CK19$^+$ в центролобулярном, перицеллюлярном и перисинусоидном фиброзе. Расширение локализации клеток α-SMA$^+$ в печени начиная со стадии F3B/F4 приводит к тому, что на стадии цирроза F6 они входят в одну группу с клетками, экспрессирующими маркеры CD45, CD34 и CD31. Клетки FAP$^+$ на стадии фиброза F1A/F1B объединяются в один фактор с клетками CD34$^+$, а на последующих стадиях F3B/F4 и F6 – с макрофагами CD206$^+$ и CD68$^+$. Макрофаги печени CD68$^+$, CD206$^+$, CX3CR1$^+$ на стадиях F1A/F1B, F3B/F4, F6 коррелируют с разными клеточными популяциями и входят в состав различных факторов. Это характеризует гетерогенность функциональных состояний макрофагов печени. На стадии узловой перестройки паренхимы F3B/F4 клетки CX3CR1$^+$, CD34$^+$ и CD45$^+$, имеющие костномозговое происхождение, объединяются в один фактор. Это связано с тем, что гепатоциты в состоянии некроза секретируют молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждениями, и индуцируют миграцию клеток из костного мозга. Клетки Fn14$^+$ на стадиях F1A/F1B и F6 входят в один фактор с макрофагами CX3CR1$^+$ [1–A, 28–A, 73–A].

3. Рост уровня мРНК гена *Fn14* в 5,00 раз ($p<0,001$) до стадии узловой перестройки паренхимы F3B/F4 является независимым фактором развития фиброза печени. Уровень мРНК гена *Cxcl12* снижается на стадиях фиброза печени F1A/F1B–F5A/F5B в 18,00 раз ($p<0,001$) с максимальным падением в 25,69 раза ($p<0,001$) на стадии полного цирроза F6 при отсутствии изменений показателя при перестройке паренхимы. Уровень мРНК гена *Cxcl12* выступает маркером фиброгенеза и определяет направленность развития фиброза. Снижение уровня мРНК генов *Notch1* в 5,58 раза ($p<0,001$) и *Yap1* в 5,00 раз ($p<0,001$) на стадии узловой трансформации паренхимы F5A/F5B характеризует период морфологического перехода фиброза в цирроз. Первый фактор включает четыре гена, проявляющих себя в прогрессировании токсического фиброза печени: *Cxcl12* ($r=0,829$, $p<0,05$), *Tweak* ($r=0,841$, $p<0,05$), *Notch1* ($r=0,848$, $p<0,05$), *Yap1* ($r=0,921$, $p<0,05$). Второй фактор описывает корреляции между генами *Mmp-9* ($r=0,791$, $p<0,05$) и *Notch2* ($r=0,836$, $p<0,05$), которые обусловливают узловую трансформацию паренхимы. В третий фактор входят гены *Ang* ($r=0,748$, $p<0,05$) и *Vegfa* ($r=0,679$, $p<0,05$), задействованные в перестройке внутрипечёночного сосудистого русла [2–A, 8–A, 10–A, 12–A, 14–A, 16–A, 17–A, 18–A, 21–A, 22–A, 32–A, 33–A, 34–A, 35–A, 43–A, 46–A, 50–A, 59–A, 60–A, 62–A, 65–A, 67–A].

4. Уровень изучаемых микроРНК по-разному влияет на процессы токсического фиброза и цирроза печени. Установлено снижение микроРНК-195-5p (8,75 раза, p<0,001), микроРНК-489-3p (2,09 раза, p<0,001), микроРНК-664-3p (1,86 раза, p<0,001) и рост микроРНК-19a-3p (1,53 раза, p<0,001), микроРНК-125b-5p (1,41 раза, p<0,001), микроРНК-130a-5p (1,56 раза, p<0,001), микроРНК-449c-5p (1,50 раза, p<0,001), микроРНК-466d (1,77 раза, p<0,001), микроРНК-495 (2,00 раза, p<0,001), микроРНК-3558-3p (2,00 раза, p<0,001) относительно контрольной точки. Уровень микроРНК-29b-1-5p характеризуется как падением в 1,50 раза (p<0,001), так и подъёмом в (1,50 раза, p<0,001) без выраженного однонаправленного вектора. Динамика уровня микроРНК-3085 не была статистически значимой ни на одной из стадий фиброза и цирроза печени (p>0,05), а уровень микроРНК-29b-3p (1,62 раза, p<0,001) и микроРНК-449a-5p (33,40 раза, p<0,001) показывает рост только в конце эксперимента на стадии полного цирроза F6 [23–А].

5. Взаимосвязь между уровнями мРНК генов *Cxcl12* и *Yap1* в норме (r=0,708, p<0,01) и на всех стадиях фиброза и цирроза (r=0,368-0,864, p<0,05), прямая и обратные связи между микроРНК-3558-3p и мРНК гена *Cxcl12* на стадиях прогрессирующего фиброза и узловой перестройки паренхимы печени F1A/F1B–F5A/F5B (r=0,350-0,548, p<0,05), рост уровня микроРНК-3558-3p и снижение уровня мРНК *Cxcl12* указывают на их совместное участие в процессе миграции клеток из красного костного мозга в печень. В норме и до начальной стадии узловой перестройки паренхимы F3B/F4 установлена взаимосвязь между уровнями мРНК генов *Notch1* и *Tweak* (r=0,391-0,711, p<0,01), а со стадии F3B/F4 и до конца эксперимента на стадии F6 выявлена связь уровней мРНК генов *Notch2* и *Fn14* (r=0,383-0,675, p<0,05) сигнальных путей Notch и TWEAK/Fn14. Уровни мРНК генов *Notch1* и *Notch2* в норме (r=0,417, p<0,05) и на начальной стадии узловой перестройки паренхимы печени F3B/F4 (r=0,378, p<0,05) взаимосвязаны. Выявленная корреляция влияет на формирование новых связей между генами и переключение патологических процессов. При развитии токсического фиброза и цирроза печени отсутствие связи между уровнями мРНК *Notch1* и *Notch2* свидетельствует о расхождении их молекулярных путей. Уровень мРНК гена *Notch1* участвует в прогрессировании фиброза, а уровень мРНК гена *Notch2* включается в узловую перестройку паренхимы печени [15–А, 24–А, 25–А, 27–А, 39–А, 48–А, 61–А, 71–А].

6. Венозный ангиогенез сопровождается формированием множества венул и мелких вен. Морфологическая гетерогенность эндотелиальных клеток проявляется: экспрессией маркеров CD34 и CD31 в стенке междольковых артерий, междольковых, центральных и собирательных вен в контрольной и опытной группах крыс; отсутствием экспрессии маркера CD34 синусоидными

эндотелиальными клетками в условиях нормы и до стадии узловой перестройки паренхимы печени F3B/F4; визуализацией клеток $CD31^+$ в норме в центролобулярной и перипортальной зонах; полным отсутствием иммуногистохимической реакции в отдельных местах промежуточной зоны. Медиана площади клеток $CD31^+$ превышает контрольный показатель на всех этапах эксперимента, на стадии цирроза F6 увеличиваясь в 7,00 раз ($p<0,001$), а медиана площади клеток $CD34^+$ возрастает лишь в 2,00 раза ($p<0,001$). На стадии полного цирроза F6 установлен рост медианы площади междольковых вен в 72,00 раза ($p<0,001$). Математическое уравнение зависимости площади междольковых вен от стадий фиброза и цирроза позволяет прогнозировать постадийное развитие фиброгенеза; значение коэффициента множественной детерминации $R^2=0,998$. Происходит увеличение среднего количества междольковых вен в 10,50 раза ($p<0,001$) и соотношения между средним количеством междольковых вен и междольковых артерий до 14,00 ($p<0,001$). Отмечается снижение среднего количества синусоидных капилляров в 3,00 раза ($p<0,001$) и падение соотношения между средним количеством синусоидных капилляров и междольковых вен до 0,40 ($p<0,001$), между средним количеством синусоидных капилляров и междольковых артерий до 5,40 ($p<0,001$) [1–А, 3–А, 6–А, 9–А, 11–А, 29–А, 30–А, 31–А, 42–А, 51–А, 70–А].

Установлено снижение уровней мРНК генов *Ang* в 53,80 раза ($p<0,001$), *Vegfa* – в 5,27 раза ($p<0,001$) относительно контрольной точки, а также прямые и обратные взаимосвязи между ними в норме ($r=0,731$, $p<0,01$), при прогрессирующем фиброзе, циррозе печени ($r=0,463$-$0,725$, $p<0,05$) за исключением стадий узловой перестройки паренхимы F5A/F5B, F5B/F6 и начальной стадии полного цирроза F6. Выявленные связи между уровнями мРНК генов *Ang* и *Notch1* ($r=0,409$-$0,817$, $p<0,05$), *Ang* и *Tweak* ($r=0,342$-$0,702$, $p<0,05$), *Vegfa* и *Notch1* ($r=0,356$-$0,649$, $p<0,05$), *Vegfa* и *Tweak* ($r=0,396$-$0,655$, $p<0,05$), прямые и обратные между уровнями генов *Ang*, *Vegfa* и микроРНК-195-5p ($r=0,462$-$0,593$, $p<0,05$), микроРНК-664-3p ($r=0,334$-$0,730$, $p<0,05$), микроРНК-489-3p ($r=0,384$-$0,550$, $p<0,05$), микроРНК-3085 ($r=0,492$-$0,504$, $p<0,05$), микроРНК-3558-3p ($r=0,358$-$0,562$, $p<0,05$) обусловливают участие уровней генов и микроРНК в структурно-функциональной перестройке внутрипечёночного сосудистого русла [17–А, 18–А, 23–А, 24–А, 53–А, 54–А, 56–А, 69–А].

7. Установлены молекулярно-генетические и морфологические критерии перехода фиброза печени в цирроз, позволяющие выделить этот процесс в самостоятельный отдельный этап фиброгенеза. Морфологически начало перехода было зафиксировано на стадии F3B/F4. В начале стадии узловой перестройки паренхимы печени F3B/F4 замедляется рост медианы

площади соединительной ткани (p=0,791), не увеличивается среднее количество (p=0,307) и медиана площади междольковых вен (p=0,999), не снижается среднее количество синусоидных капилляров (p=0,798). Рост среднего количества фиброгенных клеток α-SMA$^+$ (p=0,207) и FAP$^+$ (p=0,377), медианы площади клеток CK19$^+$ (p=0,993), Fn14$^+$ (p=0,113), CD34$^+$ (p=0,617) CD31$^+$ (p=0,783) не изменяются. Отсутствуют различия по показателям клеток, экспрессирующих маркеры CX3CR1 (p=0,998), CD206 (p=0,641) и CD45 (p=0,999). Выявлен рост уровней мРНК генов *Notch2* в 1,60 раза (p<0,001), *Mmp-9* в 1,84 раза (p<0,001) и *Nos2* в 1,69 раза (p<0,05). Установлено наибольшее количество прямых и обратных корреляционных связей между уровнем мРНК генов (r=0,354-0,803, p<0,001) и уровнем микроРНК и мРНК генов (r=0,330-0,603, p<0,001) [1–А, 19–А, 52–А].

Разработана математическая модель, основанная на значениях двух показателей – клеток FAP$^+$ и уровня мРНК *Yap1*. Площадь под ROC-кривой составляет 0,883 (p<0,001). При значениях P<0,5 определяется стадия фиброза, при значении P=0,5 устанавливается стадия перехода фиброза печени в цирроз, при значениях 0,5<P≤1 выявляется наличие полного цирроза [26–А].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. При моделировании токсического фиброза и цирроза печени рекомендуется применять интрагастральный способ введения тиоацетамида в дозе 200 мг/кг массы тела 2 раза в неделю [64–А].
2. Разработанную полуколичественную шкалу для оценки токсического фиброза печени в доклинических исследованиях целесообразно использовать при проведении фундаментальных научных работ, а также для определения механизмов морфогенеза фиброза и цирроза печени [68–А].
3. Для уменьшения объема дорогостоящих и трудоёмких доклинических лабораторных исследований оптимальным является применение математической модели, позволяющей дифференцировать стадию перехода фиброза в цирроз печени с использованием двух маркеров: количество клеток FAP$^+$ и уровень мРНК гена *Yap1* [26–А].
4. С целью прогнозирования развития стадий фиброза и цирроза печени рекомендуется применять нелинейное уравнение зависимости площади междольковых вен от стадий фиброза и цирроза [6–А].
5. В рамках предлагаемой экспериментальной модели оптимальным является использование в качестве референсных генов *Hes1* и/или *Sdha* в зависимости от изучаемой стадии фиброза [8–А].
6. Изменение уровней мРНК генов *Fn14, Cxcl12, Notch1, Yap1,* а также клеточные, паренхиматозные, стромальные и молекулярно-генетические параметры перехода фиброза печени в цирроз рекомендуется

использовать как дополнительные критерии контроля прогрессирования фиброза печени [21–А].

7. Изучение миграции клеток из костного мозга в печень при токсическом фиброзе печени целесообразно проводить совместно с определением уровня мРНК генов *Cxcl12*, *Yap1* и микроРНК-3558-3p [27–А].

8. Клетки FAP^+, синтезирующие фиброзную соединительную ткань в портальных трактах и инициирующие развитие мостовидного фиброза, следует рассматривать в качестве потенциальной мишени при разработке новых методов лечения фиброза печени [72–А].

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Монография

1–А. Лебедева, Е. И. Реактивные свойства клеток печени в зависимости от стадий развития фиброза : монография / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко. – Витебск : ВГМУ, 2024. – 230 с.

Статьи в научных изданиях Республики Беларусь, рекомендованных ВАК, и зарубежных рецензируемых научных изданиях

2–А. Щастный, А. Т. Роль уровня мРНК генов сигнального пути Notch при индуцированном фиброгенезе печени крысы / А. Т. Щастный, Е. И. Лебедева, А. С. Бабенко // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2021. – Т. 20, № 2. – С. 25–37. DOI: 10.22263/2312-4156.2021.2.25.

3–А. Лебедева, Е. И. Морфологические изменения сосудистой системы печени крыс под воздействием тиоацетамида / Е. И. Лебедева // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2021. – Т. 19, №. 3. – С. 285–293. DOI: 10.25298/2221-8785-2021-19-3-285-29.

4–А. Лебедева, Е. И. Специфичность и чувствительность модели фиброза печени у крыс в зависимости от способа введения вещества / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, П. А. Красочко // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2021. – № 1. – С. 110–116.

5–А. Lebedeva, E. I. The Role of CK19-Positive Portal Zone Cells in Thioacetamide-Induced Rat Liver Cirrhosis / E. I. Lebedeva // Cell and Tissue Biology. – 2021. – Vol. 15, № 6. – P. 568–576. DOI: 10.1134/S1990519X21060067.

6–А. Морфометрические характеристики междольковых вен и артерий при тиоацетамид-индуцированном фиброгенезе печени крыс / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, П. А. Красочко, А. С. Бабенко // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2021. – № 2. – С. 120–127.

7–А. Новый подход к морфологической оценке степени фиброза печени у экспериментальных животных / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, П. А. Красочко, А. С. Бабенко // Ученые записки Витебской государственной академии ветеринарной медицины. – 2022. – Т. 58, вып. 1. – С. 92–100.

8–А. Лебедева, Е. И. Динамика стабильности экспрессии генов SDHA, HPRT, PRL3D1 И HES1 в рамках моделирования фиброза печени крыс / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Биомедицина. – 2022. – Т. 18, № 2. – С. 17–31. DOI: 10.33647/2074-5982-18-2-17-30.

9–А. Корреляционные взаимосвязи между уровнем экспрессии мРНК генов сигнального пути Notch и факторами ангиогенеза ang, vegfa при фиброгенезе печени / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, П. А. Красочко, А. С. Бабенко // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2022. – № 1. – С. 105–110.

10–А. Лебедева, Е. И. Потенциал точки перехода фиброза в цирроз как ключевого элемента в изучении роли сигнального пути Tweak/Fn14 при индуцированном фиброгенезе печени крыс / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2022. – Т. 21, № 3. – С. 17–26. DOI: 10.22263/2312-4156.2022.3.17.

11–А. Лебедева, Е. И. Морфометрические показатели синусоидных капилляров, междольковых вен и междольковых артерий на разных стадиях экспериментального фиброза печени / Е. И. Лебедева // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2022. – Т. 11, № 3. – С. 32–38. DOI.org/10.18499/2225-7357-2022-11-3-32-38.

12–A. Lebedeva, E. I. CXCL12 mRNA Expression as an Independent Marker of Liver Fibrogenesis in Rats / E. I. Lebedeva, A. S. Babenka, A. T. Shchastniy // Moscow University Biological Sciences Bulletin. – 2022. – Vol. 77, № 4. – P. 223–230. DOI: 10.3103/S009639252204004.

13–A. Lebedeva, E. I. Changes in Macrophage Subpopulations in Rat Liver at Different Stages of Experimental Fibrosis / E. I. Lebedeva // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2023. – Vol. 175, № 2. – P. 279–285. DOI: 10.1007/s10517-023-05850-x.

14–А. Лебедева, Е. И. Уровень мРНК гена NOS2 как маркер фиброгенеза печени крыс индуцированного тиоацетамидом / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Журнал медико-биологических исследований. – 2023. – Т. 11, № 2. – С. 162–174. DOI: 10.37482/2687-1491-Z142.

15–А. Поиск взаимосвязей между ключевыми генами на разных стадиях токсического цирроза печени крыс / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, П. А. Красочко, А. С. Бабенко // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2023. – № 1. – С. 113–120.

16–A. Lebedeva, E. I. MMP-9 mRNA Expression and Bridging Fibrosis Progression in Toxic Liver Injury / E. I. Lebedeva, A. S. Babenka, A. T. Shchastniy // Acta Naturae. – 2023. – Vol. 15, № 2. – P. 50–58. DOI: 10.32607/actanaturae.17856.

17–A. FN14 mRNA Expression Correlates with an Increased Number of Veins during Angiogenesis in the Process of Liver Fibrosis / E. I. Lebedeva, A. S. Babenka, P. Hastemir, A. T. Shchastniy, D. A. Zinovkin, M. Z. I. Pranjol // International Journal of Molecular and Cellular Medicine. – 2023. – Vol. 11, № 4. – P. 274–284. DOI: 10.22088/IJMCM.BUMS.11.4.274.

18–A. Lebedeva, E. I. Cellular and Molecular Mechanisms of Toxic Liver Fibrosis in Rats Depending on the Stages of Its Development / E. I. Lebedeva, A. T. Shchastniy, A. S. Babenka // Sovremennye Tehnologii v Medicine. – 2023. – Vol. 15, № 4. – P. 50–64. DOI: 10.17691/stm2023.15.4.05.

19–А. Лебедева, Е. И. Модель токсического фиброза у крыс линии Wistar: морфологические и молекулярно-генетические параметры точки перехода в цирроз / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Гены и клетки. – 2023. – Т. 18, № 3. – С. 219–234. DOI: 10.23868/gc546031.

20–А. Лебедева, Е. И. Роль CD68+ и CD206+ клеток в прогрессировании токсического фиброза печени крыс / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2023. – Т. 67, № 5. – С. 417–424. DOI: 10.29235/1561-8323-2023-67-5-417-424.

21–А. Relationships between Cxcl12, Tweak, Notch1, and Yap mRNA Expression Levels in Molecular Mechanisms of Liver Fibrogenesis / E. I. Lebedeva, A. T. Shchastniy, A. S. Babenka, D. A. Zinovkin // Molecular Biology. – 2024. – Vol. 58, № 1. – P. 102–111. DOI: 10.1134/S0026893324010060.

22–А. Lebedeva, E. I. TNFRSF12A mRNA Expression and Distribution of TNFRSF12A+ Cells in the Rate Liver during Thioacetamide-Induced Fibrogenesis / E. I. Lebedeva, A. T. Shchastniy, A. S. Babenka // Biology Bulletin. – 2024. – Vol. 51, № 1. – P. 11–20. DOI: 10.1134/S1062359023602021.

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

24–А. Корреляционные взаимосвязи между уровнем микроРНК и мРНК вовлекаемых в патологический ангиогенез в условиях экспериментального цирроза печени / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко, Д. А. Зиновкин, Э. А. Надыров // Проблемы здоровья и экологии. – 2024. – Т. 21, № 2. – С. 87–96. DOI: 10.51523/2708-6011.2024-21-2-11.

25–А. Тиоацетамид-индуцированный экспериментальный фиброз и цирроз печени: взаимосвязи между уровнями мРНК Nos2, Mmp-9, Yap1 и микроРНК / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко, Д. А. Зиновкин, Э. А. Надыров // Ученые записки Витебской государственной академии ветеринарной медицины. – 2024. – Т. 60, вып. 3. – С. 121–130.

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

27–А. Relationship between Genes and microRNAs Involved in the Migration of Cells from the Bone Marrow during Experimental Liver Fibrosis / E. I. Lebedeva, A. T. Shchastniy, A. S. Babenka, D. A. Zinovkin, E. A. Nadyrov // Bulletin of

Experimental Biology and Medicine. – 2024. – Vol. 178, № 3. – P. 351–359. DOI: 10.1007/s10517-025-06335-9.

28–А. Особенности взаимосвязи между ключевыми клетками на разных стадиях токсического фиброза и цирроза печени / Е. И. Лебедева, А. С. Бабенко, В. Н. Грушин, П. А. Красочко, А. Т. Щастный // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2024. – № 2. – С. 112–116.

Статьи в сборниках по материалам конференций

29–А. Лебедева, Е. И. Морфометрические показатели междольковых артерий крыс при экспериментальном циррозе печени / Е. И. Лебедева // Актуальные вопросы морфологии = Probleme actuale ale morfologiei : материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 75-летнему юбилею гос. мед. и фармацевт. ун-та им. Николае Тестемицану Респ. Молдова, 30-31 окт. 2020 г. – Кишинёв, 2020. – С. 147–151.

30–А. Щастный, А. Т. Иммуногистохимическое исследование эндотелиоцитов при экспериментальном циррозе печени у крыс / А. Т. Щастный, Е. И. Лебедева // Достижения современной морфологии – практической медицине и образованию : сб. науч. ст. по материалам Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 85-летию Курского гос. мед. ун-та, 120-летию со дня рождения проф. К. С. Богоявленского, 100-летию со дня рождения проф. З. Н. Горбацевич / Федер. гос. бюджет. образоват. учреждение высш. образования «Курский гос. мед. ун-т» М-ва здравоохранения Рос. Федерации, Курское отд-ние науч. мед. о-ва анатомов, гистологов и эмбриологов России ; [под ред. В. А. Лазаренко]. – Курск : КГМУ, 2020. – С. 628–635.

31–А. Лебедева, Е. И. Изменения морфометрических показателей междольковых вен у крыс при экспериментальном циррозе печени / Е. И. Лебедева, А. С. Бабенко, А. Т. Щастный // Июньские морфологические чтения : сб. науч. тр. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 85-летию со дня рождения рос. морфолога, заслуж. деятеля науки РФ, основателя Воронежской гистохим. школы, проф. Э. Г. Быкова, Воронеж, 10-11 июня 2021 г. / под ред. И. Э. Есауленко [и др.] ; ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н. Н. Бурденко Минздрава России. – Воронеж : Научная книга, 2021. – С. 158–164.

32–А. Изменения уровня мРНК генов сигнального пути Tweak при экспериментальном фиброгенезе печени крыс / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко, С. В. Малашенко // Июньские морфологические чтения : сб. науч. тр. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 85-летию со дня рождения рос. морфолога, заслуж. деятеля науки РФ, основателя Воронежской гистохим. школы, проф. Э. Г. Быкова, Воронеж, 10-11 июня 2021 г. / под ред. И. Э. Есауленко [и др.] ; ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.

Н. Бурденко Минздрава России. – Воронеж : Научная книга, 2021. – С. 164–170.

33–А. Лебедева, Е. И. Соотношение уровней мРНК генов Tnfsf12 (TWEAK) и Tnfrsf12A (Fn14) как потенциальный маркер стадирования фиброгенеза печени крыс индуцированного тиоацетамидом / Е. И. Лебедева, О. Ф. Краецкая, А. С. Бабенко // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Биохимия XXI века», 26 нояб. 2021 г. / ФГБОУ ВО «Кубанский гос. мед. ун-т» М-ва здравоохранения Рос. Федерации ; [редкол.: Литвинова Т. Н. и др.]. – Краснодар, 2021. – С. 141–147.

34–А. Лебедева, Е. И. Анализ уровня экспрессии мРНК гена mmp9 и морфологических изменений в печени крыс при индуцированном фиброгенезе / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Достижения и проблемы фундаментальной науки и клинической медицины : материалы науч.-практ. конф. (69-й годичной) с междунар. участием, посвящ. 30-летию Гос. Независимости Респ. Таджикистан и годам развития села, туризма инородных ремесел (2019-2021), 17 нояб. 2021 г. / ГОУ «Таджикский гос. Мед. Ун-т им. Абуали Ибни Сино». – Душанбе, 2021. – Т. 2. – С. 414–416.

35–А. Лебедева, Е. И. Изменения уровня экспрессии мРНК гена nos2 в печени крыс при индуцированном фиброгенезе / Е. И. Лебедева, А. С. Бабенко, А. Т. Щастный // Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине : сб. науч. тр. II Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Санкт-Петербург, 2-3 дек. 2021 г. / под ред. А. В. Силина, Л. Б. Гайковой. – Санкт-Петербург : Изд-во СЗГМУ им. И. И. Мечникова, 2021. – С. 143–150.

36–А. Лебедева, Е. И. Токсическое поражение печени стимулирует дифференцировку CK19+/SOX9+ клеток внутрипеченочных желчных протоков и проточков в холангиоциты и гепатоциты / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Современные аспекты морфологии, патоморфологии и онкопатологии организма человека : сб. науч. ст. по материалам междунар. науч. и метод. конф., посвящ. году фундам. наук, 3-4 июня 2022 г. / Курский гос. мед. ун-т ; редкол.: В. А. Лазаренко [и др.]. – Курск : КГМУ, 2022. – С. 148–160.

37–А. Лебедева, Е. И. Фибробласты портальных зон способствуют образованию соединительной ткани при токсическом поражении печени в эксперименте / Е. И. Лебедева // Достижения морфологии: внедрение новых технологий в образовательный процесс и практическую медицину : сб. ст. Междунар. конф., приуроч. 75-летию проф. П. Г. Пивченко, 16 сент. 2022 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Белорус. гос. мед. ун-т, Белорус. науч. о-во морфологов ; под общ. Ред. Н. А. Трушель. – Минск : БГМУ, 2022. – С. 195-198. – 1 электрон. Опт. Диск (CD-ROM).

38–А. Нелинейное накопление α-SMA+ клеток в ходе индуцированного фиброгенеза печени / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, П. А. Красочко, А. С. Бабенко // Современные достижения в решении актуальных проблем агропромышленного комплекса : материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию Ин-та эксперим. Ветеринарии им. С. Н. Вышелесского (Минск, 15-16 сент. 2022 г.) / НАН Беларуси, Ин-т эксперим. Ветеринарии им. С. Н. Вышелесского. – Минск : Беларуская навука, 2022. – С. 141–145.

39–А. Лебедева, Е. И. Корреляционные связи между уровнем мРНК генов сигнального пути TWEAK/FN14 и VEGF при экспериментальном фиброзе печени / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Актуальные вопросы фундаментальной и клинической морфологии : материалы Междунар. науч.-практ. конф., приуроч. К 80-летию чл.-корр. РАН, д-ра мед. наук, проф. Д. Ф. Баженова, Россия, г. Тверь, 14 окт. 2022 г. / ФГБОУ ВО Тверской МГУ Минздрава России ; [редкол.: Л. В. Чичановская и др.]. – Тверь, 2022. – С. 280–286.

40–А. Лебедева, Е. И. Изменение количества и соотношения CD68+/CD206+ клеток в печени крыс на различных стадиях фиброза индуцированного тиоацетамидом / Е. И. Лебедева // Клеточные технологии в экспериментальной медицине : сб. науч. тр. по материалам II Междунар. науч.-практ. конф. (Курск, 30 сент. 2022 г.) / Курский гос. мед. ун-т ; сост. А. А. Денисов ; отв. Ред. Е. С. Мишина. – Курск : КГМУ, 2022. – С. 17–20. – 1 электрон. Опт. Диск (CD-ROM).

41–А. Лебедева, Е. И. Особенности развития фиброза печени у крыс Wistar индуцированного тиоацетамидом / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине : сб. науч. тр. 3-й Междунар. конф., посвящ. 110-летию д-ра биол. наук, проф. А. П. Бресткина, 1-2 дек. 2022 г. / под ред. Л. Б. Гайковой, Н. В. Бакулиной. – Санкт-Петербург : Изд-во ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России, 2022. – Ч. 1. – С. 282–289.

42–А. Лебедева, Е. И. Динамика изменений морфометрических показателей синусоидных капилляров и междольковых вен при фиброгенезе печени крыс / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Современный взгляд на проблемы внутренней медицины : сб. науч. тр. по материалам I Междунар. науч.-практ. конф., 1 дек. 2022 г., г. Курск / Курский гос. мед. ун-т ; сост. А. А. Денисов. – Курск : КГМУ, 2022. – С. 251–254.

43–А. Изменение соотношения уровня мРНК NOS2 и генов сигнального пути Notch на разных стадиях тиоацетамид-индуцированного фиброза печени / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, П. А. Красочко, А. С. Бабенко // Актуальные проблемы инфекционной патологии животных и пути их решения : материалы

Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. Дню белорус. науки и 95-летию каф. эпизоотологии и инфекц. болезней (15-16 дек. 2022 г. / Витебский гос. акад. ветеринар. медицины. – Витебск : ВГАВМ, 2023. – С. 211–214.

44–А. Лебедева, Е. И. Роль CX3CR1 клеток при экспериментальном циррозе печени крыс / Е. И. Лебедева // Одонараловские морфологические чтения : материалы Всерос. науч. конф. с междунар. участием / редкол.: Н. Т. Алексеева [и др.]. – Воронеж : Научная книга, 2022. – С. 130–133.

45–А. Лебедева, Е. И. Особенности развития цирроза печени у крыс Wistar индуцированного тиоацетамидом / Е. И. Лебедева, А. С. Бабенко, А. Т. Щастный // Современная медицина: традиции и инновации : материалы юбилейной (70-й) науч.-практ. конф. ГОУ «ТГМУ им. Абуали ибни Сино» с междунар. участием, Душанбе, 25 нояб. 2022 г. / М-во здравоохранения и соц. защиты населения Респ. Таджикистан, ГОУ «Таджикский гос. Мед. Ун-т им. Абуали ибни Сино». – Душанбе, 2022. – Т. 2. – С. 147–148.

46–А. Лебедева, Е. И. Изменение уровня экспрессии мРНК TNFRSF12A И TNFRSF12A+ клеток на разных стадиях экспериментального фиброза печени / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации : материалы 78-й науч. сес. ВГМУ, Витебск, 25-26 янв. 2023 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Витебский гос. мед. ун-т ; редкол.: Е. Г. Асирян [и др.]. – Витебск : ВГМУ, 2023. – С. 211–214. – 1 электрон. Опт. Диск (CD-ROM).

47–А. Морфометрическая оценка α-SMA+ и CD68+ клеток на разных стадиях тиоацетамид-индуцированного фиброза печени крыс Wistar / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко, С. В. Малашенко // Журнал функциональной морфологии и интегративной антропологии им. Б. А. Никитюка. – 2023. – № 2. – С. 36–41.

48–А. Лебедева, Е. И. Корреляционные связи между уровнями мРНК mmp9 и notch2 при экспериментальном циррозе печени / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // От молекулы к системной организации физиологических функций : материалы науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 90-летию со дня рождения член-кор. РАМН, проф. А. В. Завьялова (Курск, 18-20 апр. 2023 г.) / редкол.: В. А. Лазаренко, В. А. Липатов, П. В. Ткаченко. – Курск, 2023. – С. 135–137.

49–А. Лебедева, Е. И. Морфологическая гетерогенность развития фиброза печени у крыс Wistar индуцированного тиоацетамидом / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Современные аспекты морфологии, патоморфологии и онкопатологии организма человека : сб. науч. ст. по материалам междунар. науч. и метод. конф., 24-25 марта 2023 г. / Курский гос. мед. ун-т ; редкол.: В. А. Лазаренко [и др.]. – Курск : КГМУ, 2023. – С. 291–303.

50–А. Лебедева, Е. И. Факторный анализ экспрессии генов при экспериментальном фиброгенезе печени / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Биохимические исследования в медицине : сб. ст. участников Междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию каф. биол. химии белорус. гос. мед. ун-та, Минск, 6 окт. 2023 г. / под ред. А. Д. Тагановича, Н. Н. Ковганко, Д. И. Мурашко. – Минск, 2023. – С. 145–151.

51–А. Лебедева, Е. И. Использование изменения количественных показателей состояния сосудистого русла в качестве маркеров развития токсического фиброза печени / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Актуальные проблемы медицинской науки и образования (АПМНО-2023) : сб. ст. по материалам IX Междунар. науч. конф. (г. Пенза, 28-29 сент. 2023 г.) / под ред. А. Н. Митрошина, С. М. Геращенко. – Пенза : Изд-во ПГУ, 2023. – С. 30–33.

52–А. Лебедева, Е. И. Патоморфологическая характеристика печени при переходе фиброза в цирроз / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Достижения современной морфологии и их роль в практической медицине : материалы междунар. науч.-практ. конф., 23-24 нояб. 2023 г., Бухара. – Бухара, 2023. – С. 300–305.

53–А. Снижение уровня мРНК ang и vegf при прогрессирующей капилляризации синусоидов печени в экспериментальном фиброгенезе / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, П. А. Красочко, А. С. Бабенко // Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и болезней пчел в современных условиях : материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 95-летию со дня рождения д-ра ветеринар. наук, проф. Смирновой Нины Ивановны и Дню белорус. Науки, г. Витебск, 7-8 дек. 2023 г. / Витебская гос. акад. ветеринар. медицины ; ред.: Н. И. Гавриченко [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2024. – С. 164–166.

54–А. Лебедева, Е. И. Корреляционные взаимосвязи между уровнем микроРНК и морфологическими показателями внутрипеченочного сосудистого русла при экспериментальном циррозе печени / Е. И. Лебедева // «Морфология в XXI веке: теория, методология, практика», приуроч. К 105-летию выдающегося анатома, проф. Ирины Владимировны Хрусталевой и 100-летию выдающегося гистолога, проф. Ольги Викторовны Александровской, Москва, 24-26 апр. 2024 г. / ред.: С. В. Позябин [и др.]. – Москва : ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА им. К. И. Скрябина, 2024. – С. 91–93.

55–А. Лебедева, Е. И. Реакция клеток FAP+, α-SMA+, CD68+, CD206+, CX3CR1+, CK19+ при прогрессирующем циррозе печени / Е. И. Лебедева // Анатомия в XXI веке – традиция и современность : материалы Всерос. науч. конф., посвящ. 120-летию проф. М. Г. Привеса и 125-летию каф. клин. анатомии и оператив. хирургии Первого Санкт-Петербургского гос. мед. ун-та

им. Акад. И. П. Павлова / редкол.: А. Л. Акопов [и др.]. – Воронеж : Научная книга, 2024. – С. 129–132.

Тезисы в сборниках по материалам конференций

56–А. Использование профиля экспрессии генов ANG и VEGF в качестве молекулярных маркеров фиброгенеза печени / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко, С. В. Малашенко, А. В. Гусев // X Юбилейная международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика» : сб. тр. : [в 2 т.] / ФГБУ «Центр стратег. планирования и упр. медико-биол. рисками здоровью» Федер. медико-биол. агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России) [и др.] ; [редкол.: Шипулин Г. А. и др.]. – Москва, 2021. – Т. 2. – С. 364–365.

57–А. Пластичность клеток Купфера как терапевтическая мишень для лечения фиброза печени / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко, С. В. Малашенко // Материалы науч.-практ. конф. в рамках VIII Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2022) : сб. тез. – Москва: Издательство «У Никитских ворот», 2022. – С. 165–166.

58–А. Лебедева, Е. И. Модификация шкалы Ishak K. G. для оценки степени токсического фиброза печени в доклинических исследованиях / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Наукоемкие лабораторные технологии для клинической медицины : материалы XXVIII Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Москва, ЦМТ, 20-22 марта 2023 г. / под ред. В. В. Долгова. – Москва : Блок-Принт, 2023. – С. 103–105.

59–А. Лебедева, Е. И. Взаимный рост уровня мРНК nos2 и $CD68^{+}$-клеток при экспериментальном фиброгенезе печени / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2023 : конгр. с междунар. участием (Москва, 27-28 апр. 2023 г.) : сб. тез. / под ред. акад. РАН В. Г. Акимкина. – Москва : ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзор, 2023. – С. 98–99.

60–А. Лебедева, Е. И. Влияние выбора референсного гена на результат оценки уровня экспрессии мРНК при экспериментальном фиброгенезе печени / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Интерпретация результатов лабораторных исследований : материалы XXIX Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Москва, ЦМТ, 1-3 апр. 2024 г. / под ред. В. С. Долгова. – Москва : Проспект, 2024. – С. 157–159.

61–А. Лебедева, Е. И. Корреляционные связи между уровнями микроРНК при экспериментальном фиброзе печени / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2024 : конгр. с междунар. участием (Москва, 16-17 апр. 2024 г.) : сб. тез. / под ред. акад. РАН В. Г. Акимкина. – Москва : ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзор, 2024. – С. 226–227.

62–А. TWEAK/Fn14 pathway stimulates the capillarization of sinusoidal capillaries in the liver of Wistar rats in a model of liver fibrosis induced by thioacetamide / E. I. Lebedeva, A. T. Shchastniy, M. H. Kaliadka, N. N. Kolyadko, A. S. Babenka // Clinica Chimica Acta. – 2024. – Vol. 558. – P. 119647. DOI: 10.1016/j.cca.2024.119647.

63–А. Лебедева, Е. И. Клетки FAP^+ как маркеры портального и мостовидного фиброза печени / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Материалы науч.-практ. конф. в рамках X Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2024) : сб. тез. – Москва: Издательство «У Никитских ворот», 2024. – С. 72.

Методические издания

64–А. Методические рекомендации по созданию экспериментальной модели токсического фиброза и цирроза печени, индуцированного тиоацетамидом / Нац. акад. наук Беларуси, Отд-ние аграр. наук ; [подгот.: Красочко П. А., Щастный А. Т., Лебедева Е. И., Ковалев Н. А., Грушин В. Н., Фадеева М. Н., Борисовец Д. С.]. – Минск : Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского, 2021. – 14 с.

65–А. Методические рекомендации по определению уровней экспрессии мРНК генов NOTCH сигнального пути с использованием ПЦР в режиме реального времени / Нац. акад. наук Беларуси, Отд-ние аграр. наук ; [подгот.: Щастный А. Т., Красочко П. А., Лебедева Е. И., Ковалев Н. А., Бабенко А. С., Борисовец Д. С.]. – Минск : Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского, 2021. – 14 с.

66–А. Методические рекомендации по проведению иммуногистохимического метода исследования различных популяций макрофагов в ткани / Е. И. Лебедева, П. А. Красочко, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко, Н. А. Ковалев, Д. С. Борисовец, И. А. Васильчук ; Нац. акад. наук Беларуси. – Минск : Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского, 2021. – 14 с.

67–А. Лебедева, Е. И. Рекомендации по определению экспрессии белка TWEAK иммуногистохимическим методом и уровня мРНК гена TWEAK/TNFSF12 методом ПЦР в режиме реального времени в печени животных / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, П. А. Красочко, А. С. Бабенко, В. В. Жалдыбин, Д. С. Борисовец ; Нац. акад. наук Беларуси. – Минск : Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского, 2023. – 12 с.

68–А. Лебедева, Е. И. Рекомендации по оценке прогрессирования и регресса токсического фиброза печени в доклинических исследованиях / Е. И. Лебедева, П. А. Красочко, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко, В. В. Жалдыбин, Д. С. Борисовец ; Нац. акад. наук Беларуси, Отд-ние аграр. наук. – Минск :

Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского, 2023. – 8 с.

Статьи в других периодических научных изданиях

69–А. Лебедева, Е. И. Взаимное снижение уровня мРНК ANG и VEGF при прогрессирующем ангиогенезе венозной системы печени крыс Wistar в экспериментальном циррозе / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Молекулярная медицина. – 2022. – Т. 20, № 2. – С. 53–62. DOI: 10.29296/24999490-2022-02-08.

70–А. Лебедева, Е. И. Морфологическая гетерогенность CD34+ клеток при экспериментальном циррозе печени крыс / Е. И. Лебедева // Медицинский вестник Башкортостана. – 2023. – Т. 18, № 3. – С. 50–54.

71–А. Лебедева, Е. И. Взаимодействие генов NOTCH И TWEAK/Fn14 сигнальных путей при экспериментальном фиброгенезе печени / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Биохимия и молекулярная биология. – 2023. – Т. 2, № 1. – С. 31–36.

72–А. Лебедева, Е. И. Морфофункциональная оценка FAP+ и α-SMA+-клеток в различные сроки токсического фиброза печени крыс / Е. И. Лебедева // Морфологические ведомости. – 2023. – Т. 31, № 3. – С. 14–22. DOI: 10.20340/mv-mn.2023.31(3).794.

73–А. Лебедева, Е. И. Корреляционные связи между группами клеток вовлекаемых в фиброгенез печени на различных этапах / Е. И. Лебедева, А. Т. Щастный, А. С. Бабенко // Тверской медицинский журнал. – 2024. – № 1. – С. 40–49.

РЭЗЮМЭ

Лебедзева Алена Іванаўна

Клеткавыя і малекулярна-генетычныя механізмы фібрагенезу печані ў працэсе прагрэсавання фіброзу ў цыроз

Ключавыя словы: пацукі *Wistar*, фіброз і цыроз печані, тыяацэтамід, імунагістахімія, узровень мРНК генаў і мікраРНК.

Мэта работы: устанавіць фенатыпы клеткавых папуляцый, парэнхіматозных і стромальных кампанентаў печані, малекулярна-генетычныя механізмы эксперыментальнага таксічнага фіброзу і цырозу печані.

Метады даследавання: гісталагічныя, імунагістахімічныя, марфаметрычныя, палімеразная ланцуговая рэакцыя ў рэжыме рэальнага часу, статыстычныя.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: распрацавана паўколькасная шкала для ацэнкі дынамікі прагрэсавання таксічнага фіброзу і цырозу печані на даклінічным этапе даследаванняў; выяўлены змены фенатыпічнага профілю, лакалізацыі, колькасці фібрагенных клетак, рэзідэнтных і інфільтруючых макрафагаў, эндатэліяльных клетак у залежнасці ад стадыі фіброзу; устаноўлены малекулярна-генетычныя і марфалагічныя крытэрыі, якія характарызуюць пераход фіброзу ў цыроз, і распрацавана матэматычная мадэль дыферэнцыявання пераходу ад стадыі фіброзу ў стадыю цырозу печані; атрымана нелінейнае раўнанне залежнасці плошчы міждолькавых вен ад стадый фіброзу; вызначаны ўдзел узроўняў мРНК генаў, мікраРНК ў працэсах прагрэсавання фіброзу, перабудовы ўнутрыпячоначнага судзінкавага рэчышча і ўсталявана карэляцыйная сувязь паміж мікраРНК і мРНК генамі на розных этапах эксперыменту.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: атрыманыя вынікі могуць быць выкарыстаны для вызначэння механізмаў марфагенезу фіброзу печані, прагназавання развіцця стадый фіброзу і цырозу, у якасці дадатковых крытэрыяў кантролю прагрэсавання фіброзу печані.

Галіна выкарыстання: гісталогія, паталагічная анатомія, нармальная і паталагічная фізіялогія, малекулярная біялогія.

РЕЗЮМЕ

Лебедева Елена Ивановна

Клеточные и молекулярно-генетические механизмы фиброгенеза печени в процессе прогрессирования фиброза в цирроз

Ключевые слова: крысы *Wistar*, фиброз и цирроз печени, тиоацетамид, иммуногистохимия, уровень мРНК генов и микроРНК.

Цель работы: установить фенотипы клеточных популяций, паренхиматозных и стромальных компонентов печени, молекулярно-генетические механизмы экспериментального токсического фиброза и цирроза печени.

Методы исследования: гистологические, иммуногистохимические, морфометрические, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, статистические.

Полученные результаты и их новизна: разработана полуколичественная шкала для оценки динамики прогрессирования токсического фиброза и цирроза печени на доклиническом этапе исследований; выявлены изменения фенотипического профиля, локализации, количества фиброгенных клеток, резидентных и инфильтрирующих макрофагов, эндотелиальных клеток в зависимости от стадии фиброза; установлены молекулярно-генетические и морфологические критерии, характеризующие переход фиброза в цирроз, и разработана математическая модель дифференцировки перехода от стадии фиброза в стадию цирроза печени; получено нелинейное уравнение зависимости площади междольковых вен от стадий фиброза; определено участие уровней мРНК генов, микроРНК в процессах прогрессирования фиброза, перестройки внутрипечёночного сосудистого русла и установлена корреляционная связь между микроРНК и мРНК генов на различных этапах эксперимента.

Рекомендации по использованию: полученные результаты могут быть использованы для определения механизмов морфогенеза фиброза печени, прогнозирования развития стадий фиброза и цирроза, в качестве дополнительных критериев контроля прогрессирования фиброза печени.

Область применения: гистология, патологическая анатомия, нормальная и патологическая физиология, молекулярная биология.

SUMMARY

Lebedeva Elena Ivanovna

Cellular and molecular genetic mechanisms of liver fibrogenesis during the progression of fibrosis to cirrhosis

Keywords: Wistar rats, liver fibrosis and cirrhosis, thioacetamide, immunohistochemistry, mRNA level of genes and microRNA.

Aim of the study: to establish the phenotypes of cell populations, parenchymal and stromal components of the liver, molecular genetic mechanisms of experimental toxic fibrosis and liver cirrhosis.

Research methods: histological, immunohistochemical, morphometric, real-time polymerase chain reaction, statistical.

Results and their novelty: a semi-quantitative scale for assessing the dynamics of toxic liver fibrosis and cirrhosis progression at the preclinical stage of studies was developed; changes in the phenotypic profile, localization, and number of fibrogenic cells, resident and infiltrating macrophages, and endothelial cells were revealed depending on the fibrosis stage; molecular genetic and morphological criteria characterizing the transition of fibrosis to cirrhosis were established, and a mathematical model for differentiating the transition from the fibrosis stage to the cirrhosis stage of the liver was developed; a nonlinear equation was obtained for the dependence of the interlobular vein area on the fibrosis stages; the participation of mRNA levels of genes and microRNA in the processes of fibrosis progression and restructuring of the intrahepatic vascular bed was determined, and a correlation was established between microRNA and mRNA of genes at various stages of the experiment.

Recommendations for use: the obtained results can be used to determine the mechanisms of morphogenesis of liver fibrosis, predict the development of stages of fibrosis and cirrhosis, as additional criteria for monitoring the progression of liver fibrosis.

Field of application: histology, pathological anatomy, normal and pathological physiology, molecular biology.

Научное издание

Лебедева Елена Ивановна

КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФИБРОГЕНЕЗА ПЕЧЕНИ В ПРОЦЕССЕ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ФИБРОЗА В ЦИРРОЗ

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

по специальности
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Подписано в печать 11.11.2026 г.
Формат бумаги 64×64 1/16. Бумага типографская № 2.
Гарнитура Times New Roman.
Усл. печ. л. 2,96. Уч.-изд. л. 3,2.
Тираж 60 экз. Заказ № 812.

Издатель и полиграфическое исполнение
УО «Витебский государственный медицинский университет»
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 3/60 от 03.04.2014.
ЛП № 02330/453 от 30.12.2013.
Пр. Фрунзе, 27, 210023, г. Витебск.