

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ (19) BY (11) 24683



(13) C1

(45) 2025.09.05

(51) МПК

G 09B 23/28 (2006.01)

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОЧКИ ПЕРЕХОДА СТАДИИ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ В СТАДИЮ ЦИРРОЗА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

(21) Номер заявки: а 20240151

(22) 2024.07.01

(71) Заявители: Учреждение образования "Витебский государственный орденом Дружбы народов медицинский университет"; Учреждение образования "Гомельский государственный медицинский университет" (BY)

(72) Авторы: Лебедева Елена Ивановна; Щастный Анатолий Тадеушевич; Бабенко Андрей Сергеевич; Надыров Эльдар Аркадьевич; Зиновкин Дмитрий Александрович; Мартинков Виктор Николаевич (BY)

(73) Патентообладатели: Учреждение образования "Витебский государственный орденом Дружбы народов медицинский университет"; Учреждение образования "Гомельский государственный медицинский университет" (BY)

(56) ЛЕБЕДЕВА Е.И. и др. Модель токсического фиброза у крыс линии Wistar: морфологические и молекулярно-генетические параметры точки перехода в цирроз. Гены и клетки, 2023, т. 18, № 3, с. 219-234.

ЛЕБЕДЕВА Е.И. и др. Новый подход к морфологической оценке степени фиброза печени у экспериментальных животных. Ученые записки УО ВГАВМ, 2022, т. 58, № 1, с. 92-100, ISSN 2078-0109.

THEISE N.D Liver biopsy assessment in chronic viral hepatitis: a personal, practical approach. Modern Pathology, 2007, v. 20, p. 3-14.

ЩЕКОТОВА А.П. и др. Клинико-диагностические проблемы фиброза/цирроза печени. Пермский медицинский журнал, 2018, т. 35, № 5, с. 98-107.

RU 2601113 C1, 2016.

SU 1809384 A1, 1993.

(57)

Способ определения точки перехода стадии фиброза печени в стадию цирроза в эксперименте, заключающийся в том, что лабораторному животному вводят интрагастрально 2 раза в неделю в течение 16-18 недель гепатотоксический препарат в дозе 180-220 мг/кг массы тела, после чего выводят животное из эксперимента и выполняют забор образцов печени диаметром 5-10 мм для морфологического исследования и диаметром не более 5 мм для молекулярно-генетического исследования, проводят морфологическое исследование и определяют количество клеток, экспрессирующих белок активации фибробластов FAP⁺, определяют уровень экспрессии мРНК генов Yes-связанного белка типа 1 Yap 1 ме-

BY 24683 C1 2025.09.05

тодом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, после чего рассчитывают значение Р, определяющее стадию фиброзных изменений печени, по формуле:

$$P = 1/(1 + EXP(0,73 - 0,25 \times X_1 + 20,86 \times X_2)),$$

где X_1 - количество клеток, экспрессирующих белок активации фибробластов FAP⁺;

X_2 - уровень экспрессии мРНК генов Yes-связанного белка типа 1 Yap 1, и при значениях Р до 0,5 определяют стадию фиброза, при значении Р, равном 0,5, определяют точку перехода стадии фиброза печени в стадию цирроза, при значениях Р от 0,5 до 1 определяют стадию цирроза.

Изобретение относится к области экспериментальной, трансляционной медицины, биологии, направлено на моделирование хронического токсического поражения печени в виде фиброза и цирроза и может быть использовано для изучения токсических поражений печени в доклиническом исследовании гепатозащитных препаратов.

На сегодняшний день разработка эффективной антифибротической терапии остается актуальной. Анализ возможности применения антифибротических препаратов проводят с использованием лабораторных животных. До сих пор существует ряд нерешенных проблем: необходимы определения тех экспериментальных моделей, которые наиболее точно будут отражать развитие фиброза и цирроза печени у человека, востребованы диагностические и прогностические маркеры для оценки прогрессирования/регресса фиброза у животных, общепринятые шкалы полукачественной оценки фиброза подробно не изучались на животных моделях, отсутствуют критические точки, разграничающие стадии фиброза печени [1]. Изучение стадий, находящихся на удаленном интервале друг от друга, не позволяет в полной мере оценить динамику протекающих патологических процессов, а полученные результаты зачастую представляют собой лишь совокупность фактов, статистически значимых отличий, которые, несомненно, важны в качестве критериев оценки морфо- и патогенеза прогрессии заболеваний. Важным представляется вопрос поиска момента перехода фиброза в цирроз как отдельной стадии, что необходимо для новых методов медикаментозной коррекции как фиброза, так и цирроза печени.

Известна простая в применении шкала METAVIR, согласно которой стадии фиброза оценивают в баллах: 0 баллов - фиброз отсутствует; 1 балл - наличие звездчатого расширения портальных зон без образования септ; 2 балла - наличие расширения портальных зон с единичными порто-портальными септами; 3 балла - наличие многочисленных портоцентральных септ без цирроза; 4 балла - цирроз [2].

К недостаткам этой шкалы следует отнести:

морфологическая оценка стадий основывается на степени и характере распространения фиброзной ткани в порто-портальном и порто-центральном направлениях дольки печени;

определяется существенный провал в морфологическом описании между третьей стадией - многочисленные портоцентральные септы без цирроза и четвертой стадией - цирроз, при оформлении гистологического заключения возникают затруднения в отнесении к определенной стадии;

отсутствует стадия перехода от фиброза к циррозу или момент возникновения цирроза, что при морфологическом описании гистологических препаратов неотъемлемо влечет за собой ряд затруднений, например, в одном участке исследуемого образца могут находиться ложные печеночные дольки, а в другом отсутствуют.

Известна шкала полукачественной оценки фиброза, предложенная Ishak K.G., которая является чувствительной и включает большее количество стадий по сравнению с другими. Согласно шкале фиброз оценивают по 6-балльной системе: 0 баллов - фиброз отсутствует; 1 балл - наличие фиброзного расширения портальных зон с короткими фиброзными септами или без них; 2 балла - наличие фиброзного расширения большинства

портальных зон с короткими фиброзными септами или без них; 3 балла - наличие фиброзного расширения большинства портальных зон с единичными мостовидными порто-портальными септами; 4 балла - наличие фиброзного расширения портальных зон с выраженным мостовидными порто-портальными и порто-центральными септами; 5 баллов - наличие многочисленных мостовидных септ с единичными узелками (неполный цирроз); 6 баллов - цирроз, вероятный или достоверный [2].

Однако шкала разработана для клинических исследований, на лабораторных животных не изучалась, в шкале не отражена стадия перехода от фиброза к циррозу.

Известна модель токсического фиброза у крыс линии Wistar, согласно которой фиброз и цирроз печени у крыс-самцов линии Wistar индуцировали свежеприготовленным раствором тиоацетамида, который вводили интрагастрально через зонд в дозе 200 мг/кг массы тела 2 раза в неделю в течение 13 недель. Уровень мРНК генов *tweak* (*tnfsf12*), *fn14* (*tnfrsf12a*), *ang*, *vegfa*, *cxcl12* (*sdf*) и *timp-9* в печени выявляли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах. В качестве маркеров использовали α -SMA⁺, FAP⁺, CD68, CD206, CX3CR1, CD45. Измеряли площадь междольковых вен и междольковых артерий (мкм^2). Подсчитывали количество синусоидных капилляров и междольковых вен.

На основании полученных результатов установили точку перехода фиброза в цирроз как самостоятельный отдельный этап фиброгенеза. Переход был зафиксирован на стадии F5, а сам процесс - с F4/F5 по F6. При разрастании фиброзной ткани и узловой перестройке паренхимы печени не отмечали прогрессирования дистрофических процессов и увеличения зон некроза и некробиоза гепатоцитов. Количество клеток α -SMA⁺ и FAP⁺ на стадиях F4-F5 не изменилось ($p = 0,2073$ и $p = 0,3775$ соответственно). При этом достоверный цирроз стадии F6 сопровождался ростом числа этих клеток в 1,5 раза ($p < 0,00001$). По количеству клеток CD68⁺ различия выявлены только на стадии F4/F5 (в 2,0 раза выше контроля, $p < 0,00001$). Число клеток CD206⁺, CX3CR1⁺ и CD45⁺ оставалось прежним. Установлено увеличение количества междольковых вен ($P < 0,00001$) и снижение синусоидных капилляров ($p < 0,00001$) по сравнению с контролем. Переход фиброза печени в цирроз характеризовался изменением уровней экспрессии мРНК *tweak*, *fn14*, *ang*, *vegfa*, *cxcl12* и *timp-9*, а также наличием и силой взаимосвязи между ними. Между генами-мишениями выявили значимые корреляционные связи ($r = 0,50-0,84$; $p < 0,01$) [3].

Недостатком модели является отсутствие точной дифференцировки точки перехода фиброз-цирроз, что в значительной степени определяет эффективную антифибротическую терапию в эксперименте.

Задачей предлагаемого изобретения является определение морфологических и молекулярно-генетических критериев перехода стадии фиброза печени в цирроз с учетом промежуточных стадий.

Задача решается посредством того, что лабораторному животному вводят интрагастрально 2 раза в неделю в течение 16-18 недель гепатотоксический препарат в дозе 180-220 мг/кг массы тела, после чего выводят животное из эксперимента и выполняют забор образцов печени диаметром 5-10 мм для морфологического исследования и диаметром не более 5 мм для молекулярно-генетического исследования, проводят морфологическое исследование и определяют количество клеток, экспрессирующих белок активации фибробластов FAP⁺, определяют уровень экспрессии мРНК генов Yes-связанного белка типа 1 Yap 1 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, после чего рассчитывают значение Р, определяющее стадию фиброзных изменений печени, по формуле:

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

где X_1 - количество клеток, экспрессирующих белок активации фибробластов FAP⁺;

X_2 - уровень экспрессии мРНК Yes-связанного белка типа 1 Yap 1,

и при значениях Р до 0,5 определяют стадию фиброза, при значении Р, равном 0,5, определяют точку перехода стадии фиброза печени в стадию цирроза, при значениях Р от 0,5 до 1 определяют стадию цирроза.

Дизайн исследования был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными при Витебском государственном ордена Дружбы народов медицинском университете (протокол № 6 от 03.01.2019). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с рекомендациями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123 от 18.03.1986), Директивой Совета ЕЭС от 24.11.1986 и рекомендациями FELASA Working Group (1994-1996).

Фиброзные изменения печени у крыс-самцов Wistar индуцировали свежеприготовленным раствором тиоацетамида (TAA; Acros Organics, Бельгия), который вводили интрагастрально через зонд в дозе 200 мг/кг массы тела 2 раза в неделю в течение 13 недель. Крысы контрольной группы получали воду без ТАА в аналогичном объеме. Животных рандомизировали на 3 группы ($n = 12$ в каждой) в зависимости от длительности воздействия ТАА: 9 недель (1-я группа), 11 недель (2-я группа), 13 недель (3-я группа). После декапитации под кратковременным эфирным наркозом с применением гильотины из большой левой доли печени крыс забирали образцы диаметром 5-10 мм для морфологического исследования и не более 5 мм для молекулярно-генетического исследования.

Гистологические препараты исследовали с использованием компьютерных программ ImageScope Color и cellSens Standard путем микрофотосъемки 10 случайных неперекрывающихся полей зрения препаратов печени цифровой камерой OLYMPUS XC30 на базе микроскопа Olympus BX51 (Olympus, Япония). Количество клеток, экспрессирующих белок активации фибробластов FAP⁺, подсчитывали в трех полях зрения каждого гистологического среза при увеличении объектива $\times 200$, $\times 400$ ($\mu\text{м}^2$). Методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени определяли уровень экспрессии мРНК генов Yes-связанного белка типа 1 Yap 1.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета MedCalc 20 (MedCalc Software Ltd, Belgium). Анализ соответствия распределения данных нормальному распределению проводили с помощью критерия Шапиро-Уилка, анализ равенства дисперсий показателей в сопоставляемых группах проводили с использованием критерия Левена. Для описания показателей использовали значения медианы и 25-го и 75-го процентилей (Ме (25 и 75 %)). Наличие взаимосвязи между изучаемыми показателями определяли на основе коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Для анализа различий по значениям показателей на разных этапах эксперимента использовали критерий Уилкоксона для связанных групп. Построение математической модели для классификации качественной бинарной переменной осуществляли с использованием множественной логистической регрессии с пошаговым отбором предикторов, с последующим расчетом площади под кривой (AUC) с 95 % доверительным интервалом (95 % ДИ), чувствительности и специфичности на основе ROC-анализа. В качестве критического уровня статистической значимости использовали значение $p = 0,05$.

В результате была создана модель на основе двух показателей: клетки FAP⁺ и мРНК Yap1. В результате проведенного анализа разработана модель формирования цирроза печени. Модель построена с использованием логистической регрессии, основана на значениях двух показателей (клетки FAP⁺ и мРНК Yap 1) и характеризуется хорошим качеством. Полученное значение площади под ROC-кривой 0,883 свидетельствует о хороших результатах классификации случаев.

Модель была статистически значимой и удовлетворительного качества (Хи-квадрат 19,1, $p = 0,0001$, R-квадрат Кокса и Снелла 0,41, R-квадрат Нэйджелкерка 0,55). Проверка согласия Хосмера-Лемешева подтвердила качество модели: Хи-квадрат = 4,149, степень

свободы = 7, значимость $p = 0,762$. Распределение остатков не отличалось от нормального, $p = 0,406$ для критерия Шапиро-Уилка.

Практическую возможность применения способа подтверждают следующие примеры.

Пример 1.

В течение 13 недель крысе линии Wistar перорально через зонд вводили тиоцедамид в дозе 220 мг/кг два раза в неделю. После этого выводили из эксперимента, забирались образцы печени диаметром 7,5 мм для морфологического исследования и не более 4 мм для молекулярно-генетического исследования. К концу 13-й недели эксперимента стадия F5/F6, происходило поражение печени, характеризующееся нарушением трабекулярного строения печеночных долек с образованием ложных печеночных долек. На месте некроза гепатоцитов происходило интенсивное разрастание соединительной ткани с последующим формированием очагового перицеллюлярного и перисинусоидного фиброза. В портальных зонах и в соединительнотканых септах обнаруживались интенсивные лимфоидно-гистиоцитарные инфильтраты. На фоне деструкции паренхимы печени выявлялись междольковые вены, которые в большинстве случаев имели гигантский размер и неправильную форму со множеством лакун в их составе. Расположение клеток FAP⁺ округлой формы на стадии F5B/F6 [1] было различным. Клетки FAP⁺ располагались вокруг междольковых сосудов и вблизи междольковых желчных протоков. Их количество было равным 21,0. На стадии фиброза F5B/F6 уровень экспрессии мРНК для гена Yap1 составил 0,27. При расчетах значение Р было равно 0,247, что соответствовало фиброзу и отсутствию цирроза печени.

Пример 2.

В течение 18 недель крысам линии Wistar перорально через зонд вводили тиоцедамид в дозе 180 мг/кг два раза в неделю. После этого выводили из эксперимента, забирались образцы печени диаметром 9 мм для морфологического исследования и не более 4 мм для молекулярно-генетического исследования. Через 18 недель продолжающейся интоксикации крыс Wistar тиоцедамидом установили дезорганизацию трабекулярной структур печеночных долек с формированием фиброзных тяжей. Определялись участки подозрительные на формирующиеся ложные долеки. Наблюдались небольшие очаги перицеллюлярного и перисинусоидного фиброза. В фиброзной ткани и перипортально имелись очаги слабой лимфоидно-гистиоцитарной инфильтрации. Данные патогистологические критерии морфологически соответствовали признакам стадии F5/F6. FAP⁺ клетки округлой формы располагались преимущественно вблизи желчных протоков портальных зон, кровеносных сосудов и между волокнами фиброзной ткани. Количество клеток FAP⁺ = 12,0. Уровень экспрессии мРНК на для Yap1 = 0,11. Значение Р составило 0,494, что соответствовало фиброзу печени.

Пример 3.

В течение 15 недель крысам линии Wistar перорально через зонд вводили тиоцедамид в дозе 200 мг/кг два раза в неделю. После этого выводили из эксперимента, забирались образцы печени диаметром 8 мм для морфологического исследования и не более 4,6 мм для молекулярно-генетического исследования. Через 15 недель продолжающейся интоксикации крыс Wistar тиоцедамидом установили полную перестройку паренхимы печени, тотальное образование ложных печеночных долек разного диаметра и формы, выраженный диффузный портальный и перипортальный фиброз, диффузный перицеллюлярный фиброз, крупноочаговый некроз гепатоцитов, очаговые кровоизлияния в паренхиме, в портальных зонах и фиброзных септах, интенсивные лимфоидно-гистиоцитарные инфильтраты. Эти патогистологические критерии соответствовали морфологическим признакам полного цирроза, стадия F6. На стадии полного цирроза популяция FAP⁺ расширила свою локализацию в печени. Клетки FAP⁺ округлой формы располагались в синусоидных капиллярах, вокруг сосудов, вблизи желчных протоков портальных зон и между волокнами фиброзной ткани. Количество клеток FAP⁺ = 26,0. Уровень экспрессии

мРНК составил для гена Yap 1 = 0,20. Полученное значение Р соответствовало 0,832. Все показатели соответствовали циррозу печени.

Пример 4.

В течение 18 недель крысам линии Wistar перорально через зонд вводили тиоцедамид в дозе 180 мг/кг два раза в неделю. После этого выводили из эксперимента, забирались образцы печени диаметром 9 мм для морфологического исследования и не более 4 мм для молекулярно-генетического исследования. Через 18 недель продолжающейся интоксикации крыс Wistar тиоцедамидом установили нарушение трабекулярной структуры печеночных долек с участками фиброзных тяжей, частично формирующих ложные печеночные дольки. Отмечались участки интенсивного разрастание соединительной ткани с последующим формированием очагового перицеллюлярного и перисинусоидного фиброза. В перипортальных зонах и в соединительнотканых септах обнаруживались интенсивные лимфоидно-гистиоцитарные инфильтраты. Эти патогистологические критерии соответствовали морфологическим признакам стадии F5/F6. Клетки FAP⁺ округлой формы располагались периваскулярно, вблизи желчных протоков портальных зон и между волокнами фиброзной ткани. Количество клеток клеток FAP⁺ = 26,0. Уровень экспрессии мРНК на для Yap1 = 0,17. Значение Р составило 0,902, что соответствовало циррозу печени.

Предлагаемый способ позволяет установить точку перехода фиброза в цирроз как самостоятельный отдельный этап фиброгенеза печени, что имеет исключительные патоморфологические и молекулярно-генетические особенности, представляющие фундаментальный и клинический интерес, и расширяет знания о патоморфологических изменениях печени. Использование полученной модели при проведении доклинических испытаний новых антифибротических лекарственных средств позволит повысить эффективность таких испытаний в области экспериментальной гепатологии и фармакологии. Кроме того, изобретение может быть полезно для изучения патогенеза фиброза и цирроза печени и определения новых потенциальных молекулярных мишней для антифибротической терапии. Немаловажным аспектом является снижение числа дорогостоящих, трудоемких лабораторных тестов.

Источники информации:

1. ЛЕБЕДЕВА Е.И. и др. Новый подход к морфологической оценке степени фиброза печени у экспериментальных животных. Ученые записки УО ВГАВМ, 2022, т. 58, вып. 1, с. 92-100.
2. THEISE N.D. et al. Liver biopsy assessment in chronic viral hepatitis: a personal, practical approach. Mod. Pathol., 2007, vol. 20, suppl. 1, p. 3-14.
3. ЛЕБЕДЕВА Е.И. и др. Модель токсического фиброза у крыс линии Wistar: морфологические и молекулярно-генетические параметры точки перехода в цирроз. Гены и клетки, 2023, т. 18, № 3, с. 219-234.