



Корреляционные взаимосвязи между уровнем микроРНК и мРНК, вовлекаемых в патологический ангиогенез в условиях экспериментального цирроза печени

Е. И. Лебедева¹, А. Т. Щастный¹, А. С. Бабенко², Д. А. Зиновкин³, Э. А. Надыров³

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

²Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Беларусь

³Гомельский государственный медицинский университет, г. Гомель, Беларусь

Резюме

Цель исследования. Выявить взаимосвязи между уровнем микроРНК и мРНК при патологическом ангиогенезе в условиях экспериментального токсического цирроза печени.

Материалы и методы. Фиброз и цирроз печени у крыс-самцов линии *Wistar* индуцировали свежеприготовленным раствором тиацетамида в течение 17 недель. Динамику процесса изучали в девяти временных точках. Измеряли площадь междольковых вен и междольковых артерий в микрометрах. Подсчитывали количество междольковых артерий, междольковых вен и синусоидных капилляров. Уровень экспрессии мРНК генов *Ang*, *Vegfa*, *Tweak*, *Fn14*, *Notch1*, *Notch2* и микроРНК-195-5р, микроРНК-664-3р, микроРНК-489-3р, микроРНК-3085, микроРНК-3558-3р в печени определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты. Установлено, что при прогрессирующем венозном ангиогенезе, а также на фоне изменения количества междольковых вен, синусоидных капилляров, площади междольковых вен характер и сила корреляционных взаимодействий между генами *Ang*, *Vegfa*, *Tweak*, *Fn14*, *Notch1*, *Notch2* и микроРНК-195-5р, микроРНК-664-3р, микроРНК-489-3р, микроРНК-3085, микроРНК-3558-3р связаны со стадией фиброза и цирроза печени. Выявлены прямые сильные, средние и умеренные корреляционные связи ($p < 0,01$) между генами *Ang*, *Vegfa*, *Tweak*, *Fn14*, *Notch1*, *Notch2* на протяжении всего эксперимента.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемые нами микроРНК-195-5р, микроРНК-664-3р, микроРНК-489-3р, микроРНК-3085, микроРНК-3558-3р вовлекаются в процессы перестройки внутрипеченочного сосудистого русла на разных стадиях экспериментального токсического фиброза и цирроза печени. Результаты исследования позволяют не только раскрыть дополнительные механизмы формирования указанных состояний, но и выявить биологическую роль изученных микроРНК в прогрессировании фиброза и цирроза печени в качестве потенциальных мишеней для изучения патогенеза и разработки методов лечения.

Ключевые слова: эксперимент, фиброз и цирроз печени, экспрессия мРНК и микроРНК, корреляционный анализ

Вклад авторов. Лебедева Е.И.: разработка дизайна исследования, обзор литературы, эксперимент на животных, обработка и анализ данных, написание текста статьи; Щастный А.Т.: разработка дизайна исследования, обсуждение и выводы, утверждение окончательного варианта статьи; Бабенко А.С.: обзор литературы, метод ПЦР-РВ, статистическая обработка и анализ данных, библиография; Зиновкин Д.А.: статистическая обработка и анализ данных; Надыров Э.А.: статистическая обработка и анализ данных, обсуждение и выводы, утверждение окончательного варианта статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Для цитирования: Лебедева ЕИ, Щастный АТ, Бабенко АС, Зиновкин ДА, Надыров ЭА. Корреляционные взаимосвязи между уровнем микроРНК и мРНК, вовлекаемых в патологический ангиогенез в условиях экспериментального цирроза печени. *Проблемы здоровья и экологии*. 2024;21(2):87–96. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2024-21-2-11>

Correlation relationships between the levels of microRNA and mRNA involved in pathological angiogenesis in experimental liver cirrhosis

Elena I. Lebedeva¹, Anatoliy T. Shchastniy¹, Andrei S. Babenka²,
Dmitry A. Zinovkin³, Eldar A. Nadyrov³

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

²Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

³Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

Abstract

Objective. To identify the relationships between the levels of microRNA and mRNA during pathological angiogenesis under the conditions of experimental toxic liver cirrhosis.

Materials and methods. Fibrosis and liver cirrhosis were induced in male *Wistar* rats using a freshly prepared solution of thioacetamide over 17 weeks. The dynamics of the process were studied at 9 time points. The areas of interlobular veins and interlobular arteries were measured in micrometers. The numbers of interlobular arteries, interlobular veins, and sinusoidal capillaries were counted. The expression levels of mRNA genes *Ang*, *Vegfa*, *Tweak*, *Fn14*, *Notch1*, *Notch2*, and microRNAs-195-5p, microRNAs-664-3p, microRNAs-489-3p, microRNAs-3085, microRNAs-3558-3p in the liver were determined by real-time polymerase chain reaction.

Results. It was found that during progressive venous angiogenesis, as well as against the background of changes in the number of interlobular veins, sinusoidal capillaries, and the area of interlobular veins, the nature and strength of correlational interactions between the genes *Ang*, *Vegfa*, *Tweak*, *Fn14*, *Notch1*, *Notch2*, and microRNAs-195-5p, microRNAs-664-3p, microRNAs-489-3p, microRNAs-3085, microRNAs-3558-3p are associated with the stage of fibrosis and liver cirrhosis. Strong, moderate, and mild correlational links ($p < 0.01$) were identified between the genes *Ang*, *Vegfa*, *Tweak*, *Fn14*, *Notch1*, *Notch2* throughout the experiment.

Conclusion. The obtained results indicate that the studied microRNAs - microRNAs-195-5p, microRNAs-664-3p, microRNAs-489-3p, microRNAs-3085, microRNAs-3558-3p - are involved in the processes of restructuring the intrahepatic vascular bed at different stages of experimental toxic fibrosis and liver cirrhosis. The results of the study not only reveal additional mechanisms of formation of the indicated conditions but also identify the biological role of the studied microRNAs in the progression of fibrosis and liver cirrhosis as potential targets for studying pathogenesis and developing treatment methods.

Keywords: *experiment, liver fibrosis and cirrhosis, mRNA and microRNA expression, correlational analysis*

Author contributions. Elena I. Lebedeva: study design development, literature review, animal experimentation, data processing and analysis, article text writing; Anatoliy T. Shchastniy: study design development, discussion and conclusions, final version approval of the article; Andrei S. Babenka: literature review, qPCR method, statistical processing and analysis of data, bibliography; Dmitry A. Zinovkin: statistical processing and analysis of data; Eldar A. Nadyrov: statistical processing and analysis of data, discussion and conclusions, final version approval of the article.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study was conducted without sponsorship.

For citation: Lebedeva EI, Shchastniy AT, Babenka AS, Zinovkin DA, Nadyrov EA. Correlation relationships between the levels of microRNA and mRNA involved in pathological angiogenesis in experimental liver cirrhosis. *Health and Ecology Issues*. 2024;21(2):87–96. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2024-21-2-11>

Введение

Патологический ангиогенез в печени — это крайне сложный, высокоорганизованный и до конца не изученный процесс. Семейство фактора роста эндотелия сосудов (VEGFs), ангиопоэтин-1 и ангиопоэтин-2 (*Ang-1*, *Ang-2*) являются индукторами патологического ангиогенеза. В научной литературе показано, что VEGF может выступать инициатором активации, миграции эндотелиальных клеток, формирования и функционирования вновь сформированных сосудов. На текущий момент сведения о функции ANG в патологическом ангиогенезе печени малочисленны [1–6].

Известно, что сигнальный путь Notch играет одну из ключевых ролей во время эмбрионального васкулогенеза. В ряде работ отмечается связь генов *Notch1* и *Notch2* с VEGF при патологическом ангиогенезе [7–10]. Сигнальный путь TWEAK/*Fn14* является одним из широко используемых природой сигнальных путей. TWEAK, действуя через рецептор клеточной поверхности *FN14*, являющейся провоспалительным и проангиогенным цитокином, может регулировать дифференцировку клеток, участвовать в процессах воспаления и фиброза, а также патологического ангиогенеза [11–13].

В последнее время микроРНК (малые не-кодирующие молекулы РНК) привлекают внимание исследователей в качестве регуляторов ангиогенеза. Показано, что микроРНК-424-5р, микроРНК-34а, микроРНК-384-5р регулируют ангиогенез через сигнальный путь Notch [14, 15–17]. К настоящему времени раскрыть полные патогенетические механизмы влияния микроРНК на экспрессию проангиогенных факторов и генов сигнальных путей Notch и TWEAK/Fn14 при патологическом ангиогенезе печени пока не удалось.

Вероятно, это связано, во-первых, с тем, что изучение микроРНК проводят преимущественно методом *in vitro*, а полученные результаты *in vivo* подтверждаются не всегда; во-вторых, из-за большого разнообразия клеточных популяций в печени и быстро меняющегося микроокружения (ниши) микроРНК на разных стадиях фиброгенеза могут оказывать различное регуляторное действие на гены и демонстрировать противоположные результаты; в-третьих, одна микроРНК может взаимодействовать с мРНК нескольких генов одновременно и, в свою очередь, уровень мРНК конкретного гена может регулироваться многими микроРНК.

Для более глубокого понимания молекулярно-генетических механизмов при перестройке внутрипеченочного сосудистого русла мы обратили внимание на необходимость продолжения исследований, направленных на поиск взаимосвязи между генами и микроРНК. В качестве регуляторов патологического ангиогенеза при токсическом фиброзе и циррозе печени были выбраны гены *Ang*, *Vegfa*, *Tweak* (*Tnfrsf12*), *Fn14* (*Tnfrsf12a*), *Notch1* и *Notch2*. В работе, опубликованной нами ранее, представлены сведения об изменении уровня экспрессии мРНК данных генов [18]. С этими генами связана работа более 100 микроРНК. По данным научной литературы, а также на основании информации, размещенной в открытой онлайн-базе данных miRDB (<https://mirdb.org/>), были выбраны микроРНК-19а-3р, микроРНК-29б-3р, микроРНК-29б-1-5р, микроРНК-34б-5р, микроРНК-125б-5р, микроРНК-130а-5р, микроРНК-195-5р, микроРНК-449а-5р, микроРНК-449с-5р, микроРНК-466d, микроРНК-489-3р, микроРНК-495, микроРНК-664-3р, микроРНК-3085, микроРНК-3558-3р [19]. Критерии включения микроРНК в исследование: связь с функцией гена-мишени; минимальное значение показателя «Target Rank»; максимальное значение показателя «Target Score», что в сумме увеличивает вероятность того, что ген-мишень является мишенью для микроРНК на основании алгоритма «MirTarget» с использованием данных высокопроизводительного секвенирования.

Оценка уровня отобранных микроРНК показала, что микроРНК-195-5р, микроРНК-664-3р, микроРНК-489-3р, микроРНК-3085, микроРНК-3558-3р продемонстрировали наибольшую динамику экспрессии в ходе экспериментального фиброза и цирроза [20].

Мы предположили, что микроРНК, экспрессия которых изменилась, могут быть связаны с генами-мишенями и изучение этих взаимосвязей на разных этапах фиброза и цирроза сможет помочь выявить потенциальные мишени для диагностики и лечения фиброза, а также получить новые данные о механизмах инициации и развития фиброза и перехода его в цирроз.

Цель исследования

Выявить взаимосвязи между уровнем микроРНК и мРНК при патологическом ангиогенезе в условиях экспериментального токсического цирроза печени.

Материалы и методы

Дизайн исследования был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными при учреждении образования «Витебский государственный орден Дружбы народов медицинский университет» (протокол № 13 от 31.03.2022 г.). Фиброз и цирроз печени у крыс-самцов линии *Wistar* индуцировали свежеприготовленным раствором тиацетамида (ТАА), который вводили интрагастралью 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. Из эксперимента данную группу выводили одномоментно спустя 17 недель. 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), 17 недель (8-я группа, полный цирроз) — и выводили из эксперимента согласно разделению на группы.

Для получения обзорных гистологических препаратов срезы печени окрашивали гематоксилином и эозином, а для выявления соединительной ткани — по Маллори. Степень фиброза определяли по модифицированной полуколичественной шкале фиброза печени для оценки прогрессирования и регресса токсического фиброза печени в доклинических исследованиях [21]. Ги-

стологические препараты исследовали с использованием компьютерных программ ImageScore Color и cellSens Standard. Определяли площадь соединительной ткани в процентах к площади изображения без учета степени экспрессии маркеров [22]. Измеряли площадь междольковых вен и междольковых артерий в микрометрах (мкм). Подсчитывали количество междольковых артерий, междольковых вен и синусоидных капилляров. Все измерения осуществляли путем микрофотосъемки 10 случайных неперекрывающихся полей зрения препаратов печени цифровой камерой OLYMPUS XC30 (Япония) на базе микроскопа OLYMPUS BX51 (Япония) при увеличении $\times 200$, $\times 400$ (мкм²).

Уровень экспрессии мРНК генов *Ang*, *Vegfa*, *Notch1*, *Notch2*, *Fn14*, *Tweak* проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием флуоресцентно-меченых зондов. Уровень микроРНК-195-5р, микроРНК-664-3р, микроРНК-489-3р, микроРНК-3085, микроРНК-3558-3р определяли методом ПЦР-РВ с этапом двухконцевой обратной транскрипции [23]. Формирование панели целевых микроРНК, выделение суммарной РНК и микроРНК, наборы олигонуклеотидных праймеров для проведения реакции обратной транскрипции и ПЦР-РВ, проведения двухконцевой реакции обратной транскрипции, нормализация

данных ПЦР-РВ подробно изложены в статьях [18, 20].

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета IBM SPSS Statistics, версия 27.0.1.0 (IBM Company, США). Поскольку все исследуемые показатели характеризовались распределением, отличным от нормального, использовали непараметрические методы. Количественные экспериментальные данные представлены в виде медиан и 1-го и 3-го квартилей. Для выявления связи между изучаемыми признаками использовали непараметрическую ранговую корреляцию Спирмена.

Результаты и обсуждение

Структурно-функциональные нарушения внутрипеченочного сосудистого русла крыс линии Wistar

На стадии фиброза F1A/F1B (3 недели эксперимента) большинство междольковых сосудов, центральных и собирательных вен не были наполнены кровью. В отдельных участках паренхимы встречались расширенные синусоидные капилляры, в которых форменные элементы крови выявлялись редко. Изменение площади междольковых вен представлено в таблице 1 и на рисунке 1.

Таблица 1. Показатели количества междольковых вен, количества синусоидных капилляров и площади междольковых вен (мкм) в контрольной и экспериментальных группах

Table 1. Indicators of the number of interlobular veins, the number of sinusoidal capillaries and the area of interlobular veins (μm) in control and experimental groups

Сроки наблюдения (стадии фиброза / недели эксперимента)	Площадь междольковых вен, мкм	Количество междольковых вен, n	Количество синусоидных капилляров, n
F0 (контроль)	3317,09 (2085,58; 4409,36)	2,91 (1,00; 5,00)	34,80 (29,00; 43,00)
F1A/F1B (3 недели)	5165,41 (3149,09; 7501,88)	3,69 (2,00; 7,00)	32,72 (23,00; 39,00)
F2A/F2B-F3A (5 недель)	5172,56 (2486,53; 9317,51)	8,13 (2,00; 15,00)	25,16 (15,00; 31,00)
F2B-F3A/F3B (7 недель)	6791,10 (4847,67; 11537,73)	10,83 (4,00; 18,00)	22,86 (12,00; 34,00)
F3B/F4 (9 недель)	20350,00 (15099,46; 26791,33)	14,00 (8,00; 20,00)	21,58 (12,00; 29,00)
F5A/F5B (11 недель)	23247,96 (10587,31; 34569,62)	17,33 (6,00; 27,00)	19,36 (11,00; 27,00)
F5B/F6 (13 недель)	59733,70 (22542,94; 95224,18)	23,16 (10,00; 36,00)	15,88 (6,00; 24,00)
F6 (15 недель)	64296,56 (25590,13; 122752,20)	27,75 (21,00; 37,00)	13,30 (6,00; 22,00)
F6 (17 недель)	238636,40 (150357,20; 473647,10)	30,61 (12,00; 40,00) ¹	11,83 (5,00; 22,00)

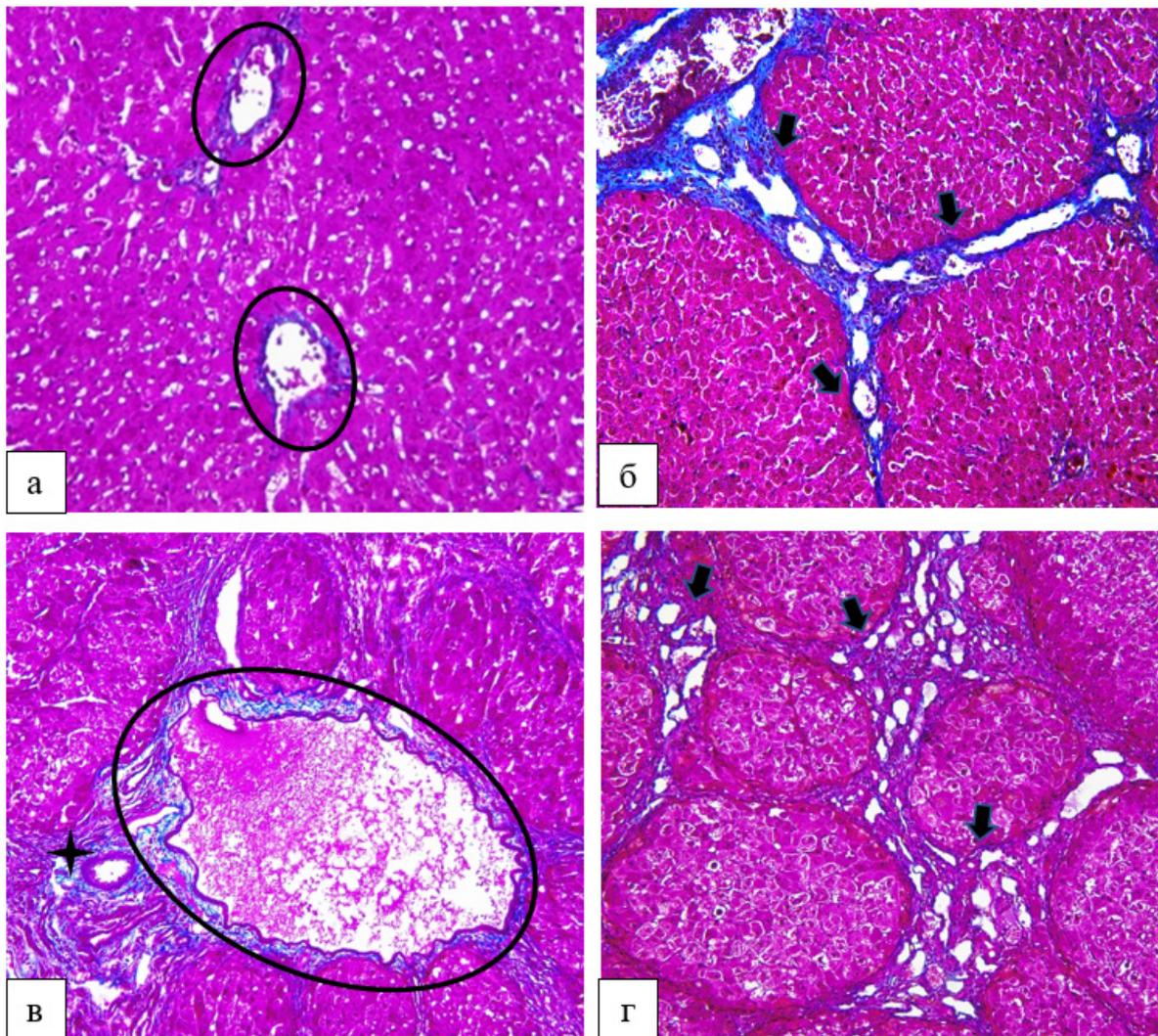


Рисунок 1. Гистологические препараты печени крыс после начала эксперимента: а — через 3 недели; б — через 9 недель; в — через 15 недель; г — через 17. Обозначения: стрелки — венозный ангиогенез, оральные рамки — междольковые вены, звездочка — междольковые артерии. Окраска по Маллори. Увеличение $\times 200$

Figure 1. Histological preparations of rat liver at 3 (a), 9 (b), 15 (c), 17 (d) weeks after the start of the experiment. Notations: venous angiogenesis (arrows), interlobular veins (oval frames), interlobular arteries (star). Mallory staining. Magnification $\times 200$

При установленном мостовидном фиброзе печени F2A/F2B-F3A (5 недель) изменение площади междольковых вен оставалось на уровне предыдущего срока. Все последующие стадии фиброза (недели эксперимента) характеризовались увеличением данного показателя, и к концу эксперимента площадь междольковых вен увеличилась в 72,00 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой (таблица 1).

Стадия узловой перестройки паренхимы печени F3B/F4-F5B-F6 (9–13 недель) сопровождалась значительными изменениями в сосудистом русле. Отмечали выраженный патологический ангиогенез в портальных зонах и фиброзных соединительнотканых септах. Он проявлялся формированием множества мелких кровеносных сосудов венозного типа: венул и мелких вен

(рисунок 1б). В некоторых гистологических срезах встречались очаговые и диффузно локализованные расширения синусоидных капилляров. Наряду с этим иногда создавалось впечатление сдавленности синусоидных капилляров из-за происходящей гипертрофии гепатоцитов. В отдельных участках паренхимы отмечали мелкие очаги кровоизлияний, а также к ним присоединившихся или отдельно расположенных свежих геморрагий, что свидетельствовало о повреждении стенки синусоидов. Вокруг небольших очагов кровоизлияний отсутствовала воспалительная реакция. Большинство сосудов были заполнены эритроцитарными массами, при этом отдельные из них имели выраженное полнокровие. Подобные изменения указывают на нарушение венозного оттока крови из печени. Наряду с выявленными

изменениями встречались зоны, в которых кровенаполнение сосудов практически соответствовало норме.

На фоне выраженной деструкции паренхимы печени F6 (полный цирроз, 15–17 недель) наряду с образованием мелких сосудов в портальных зонах и фиброзных соединительнотканых септах выявлялись гигантские междольковые вены (рисунок 1в, г). Это указывает на очевидную перестройку венозной системы портальной вены и, вероятно, на формирование коллатералей и шунтов, перенаправляющих венозную кровь в обход печеночных долек. Вместе с тем старые и свежие очаги кровоизлияний обнаруживали в каждом гистологическом срезе печени. Обращает на себя внимание факт того, что площадь междольковых артерий статистически значимо не изменилась на всех стадиях фиброза печени крыс ($p > 0,05$).

Принимая во внимание наличие выраженного патологического венозного ангиогенеза, было принято решение посчитать количество междольковых вен, синусоидных капилляров и междольковых артерий на различных стадиях фиброгенеза печени. Различия между количеством междольковых вен и синусоидных капилляров на всех этапах эксперимента по сравнению с контрольной группой представлены в таблице 1.

Как видно из данных таблицы 1, со стадии фиброза F2A/F2B-F3A количество междольковых вен статистически значимо увеличивалось, а синусоидов уменьшалось по сравнению с контрольной группой. В то же время количество междольковых артерий на протяжении всего эксперимента оставалось практически на одном уровне ($p > 0,05$). К концу эксперимента количество междольковых вен увеличилось в 10,5 раза ($p < 0,001$), а синусоидов снизилось в 3,0 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой (таблица 1).

Уровень мРНК генов, микроРНК и корреляционные взаимосвязи между ними при экспериментальном фиброзе и циррозе печени

Относительный уровень мРНК гена *Ang*, гена *Vegfa*, гена *Tweak* был статистически значимо снижен на протяжении всего эксперимента. Максимальное снижение установлено на стадии полного цирроза F6 для гена *Ang* в 53,8 раза ($p < 0,001$), гена *Vegfa* — в 6,62 раза ($p < 0,001$) и гена *Tweak* — в 23,8 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контролем. Гены *Notch1*, *Notch2* и *Fn14* на прогрессирование фиброза и цирроза печени «реагировали» несколько иначе. Наблюдались подъемы и снижение их уровня мРНК. Максимальное падение уровня мРНК *Notch1* в 5,58 раза ($p < 0,001$) выявлено на стадиях F5A/F5B-F6 (11–13 недель) по сравнению с контрольной группой. При этом на стадии F3B/F4 (9 недель) экспрессия мРНК *Notch2* выросла в 1,60 раза ($p < 0,001$), а мРНК *Fn14* — в 5,0 раза ($p < 0,001$) по сравнению с контролем [18].

В предыдущем исследовании было показано, что динамика уровня микроРНК-3085 не была статистически значимо измененной ($p > 0,05$) по сравнению с контрольной группой на протяжении всего эксперимента. При этом микроРНК-195-5p ($p < 0,001$), микроРНК-664-3p ($p < 0,001$), микроРНК-489-3p ($p < 0,001$) и микроРНК-3558-3p ($p < 0,001$) изменили относительный уровень в два и более раза [20].

Показатели корреляционных взаимосвязей между уровнем мРНК генов и уровнем микроРНК и мРНК генов в гомеостатических условиях и на разных стадиях фиброза и цирроза печени представлены в таблице 2.

Таблица 2. Корреляционные взаимосвязи между уровнем мРНК генов и уровнем микроРНК и мРНК генов в гомеостатических условиях и на разных стадиях фиброза и цирроза печени
Table 2. Correlational relationships between the levels of gene mRNA and the levels of microRNA and gene mRNA under homeostatic conditions and at different stages of liver fibrosis and cirrhosis

Мишень	Коэффициенты корреляционной взаимосвязи Спирмена					
	<i>Ang</i>	<i>Vegfa</i>	<i>Notch1</i>	<i>Notch2</i>	<i>Tweak</i>	<i>Fn14</i>
F0 (контроль)						
<i>Ang</i>	—	0,731**	—	—	—	—
<i>Notch1</i>	0,453**	0,356*	—	0,417*	0,783**	—
<i>Notch2</i>	—	—	—	—	0,546**	0,545**
<i>Tweak</i>	0,342*	0,401*	—	—	—	—
микроРНК-3558-3p	—	—	—	—	—	-0,509**
F1A/F1B (3 недели)						
<i>Ang</i>	—	0,683**	—	—	0,380*	—
<i>Notch1</i>	0,553**	0,603**	—	—	0,391*	—

Продолжение таблицы 2
Continuation of Table 2

Мишень	Коэффициенты корреляционной взаимосвязи Спирмена					
	Ang	Vegfa	Notch1	Notch2	Tweak	Fn14
F1A/F1B (3 недели)						
микроРНК-195-5р	—	—	—	—	-0,488**	—
микроРНК-489-3р	—	-0,473**	—	—	—	—
F2A/F2B-F3A (5 недель)						
Ang	—	0,650**	—	—	—	—
Notch1	0,742**	0,649**	—	—	0,711**	0,417*
Notch2	0,376*	—	—	—	—	—
Tweak	0,694**	0,535**	—	—	—	0,685**
микроРНК-664-3р	—	—	—	0,388*	—	—
F3A/F3B (7 недель)						
Ang	—	0,725**	—	—	—	—
Notch1	0,423*	0,499**	—	—	0,627**	0,683**
Tweak	0,444**	0,396*	—	—	—	0,582**
Fn14	—	0,391*	—	—	—	—
микроРНК-195-5р	—	—	—	—	—	-0,414*
микроРНК-664-3р	—	—	—	0,359*	—	—
микроРНК-489-3р	-0,500**	—	—	—	-0,412*	—
микроРНК-3558-3р	—	—	—	-0,330*	—	-0,414*
F3B/F4 (9 недель)						
Ang	—	0,598**	—	—	—	—
Notch1	0,422*	0,598**	—	—	0,449**	—
Notch2	0,561**	0,558**	0,378*	—	0,384*	0,378*
микроРНК-195-5р	—	—	—	-0,518**	—	-0,382*
микроРНК-664-3р	—	—	—	—	—	-0,346*
микроРНК-489-3р	-0,449**	-0,393*	—	-0,578**	—	—
микроРНК-3085	—	—	-0,393*	—	-0,440*	—
микроРНК-3558-3р	-0,538**	-0,483**	—	-0,603**	-0,330*	—
F5A/F5B (11 недель)						
Notch1	0,409*	—	—	—	—	—
Notch2	0,386*	0,399*	—	—	0,364*	0,550**
Tweak	0,570**	0,655**	—	—	—	—
микроРНК-195-5р	—	-0,593**	—	—	-0,366*	—
микроРНК-664-3р	0,467**	0,730**	—	—	0,662**	—
микроРНК-489-3р	0,517**	0,532**	—	—	0,330*	—
микроРНК-3558-3р	—	0,562**	—	0,525**	0,390*	—
F5B-F6 (13 недель)						
Notch1	0,693**	—	—	—	—	—
Notch2	—	—	—	—	—	0,383*
Tweak	0,401*	—	—	—	—	—
Fn14	—	0,396*	—	—	—	—
микроРНК-195-5р	—	—	—	—	-0,603**	-0,353*
микроРНК-664-3р	—	-0,334*	—	—	—	—
микроРНК-489-3р	—	0,384*	—	—	—	—
микроРНК-3085	-0,492**	0,504**	—	—	—	—
микроРНК-3558-3р	—	—	—	—	-0,464**	-0,491**

Окончание таблицы 2
End of Table 2

Мишень	Коэффициенты корреляционной взаимосвязи Спирмена					
	<i>Ang</i>	<i>Vegfa</i>	<i>Notch1</i>	<i>Notch2</i>	<i>Tweak</i>	<i>Fn14</i>
F6 (15 недель)						
<i>Notch1</i>	—	0,476*	—	—	—	—
<i>Notch2</i>	—	—	—	—	—	0,675**
микроРНК-664-3р	—	—	—	—	-0,446**	—
микроРНК-3085	—	—	—	0,424*	-0,481**	—
микроРНК-3558-3р	-0,390*	—	—	—	—	—
F6 (17 недель)						
<i>Ang</i>	—	0,463**	—	—	—	—
<i>Vegfa</i>	—	—	—	—	—	—
<i>Notch1</i>	0,817**	0,543**	—	—	0,707**	—
<i>Notch2</i>	—	0,543**	—	—	0,486**	0,617**
<i>Tweak</i>	0,702**	0,587**	—	—	—	—
микроРНК-195-5р	0,462**	0,504**	—	—	0,374*	—
микроРНК-489-3р	-0,550**	—	-0,446**	—	-0,531**	—
микроРНК-3558-3р	—	—	—	0,341*	—	0,409*

*Статистическая значимость результатов при $p < 0,05$.

**При $p < 0,01$.

Анализ данных таблицы 2 показал, что в условиях физиологической нормы при прогрессирующем фиброзе и циррозе печени гены *Ang* и *Vegfa* связаны между собой прямыми сильными, средними и умеренными корреляционными связями. При этом на стадиях узловой перестройки паренхимы F5A/F5B-F6 (11, 13, 15 недель) взаимосвязи не установлены.

Следует отметить, что в норме гены *Ang* и *Vegfa* связаны с генами *Notch1*, *Tweak*. Вместе с этим на протяжении всего эксперимента между этими генами изменяется сила связи. На стадии портального фиброза F1A/F1B (3 недели) между генами *Ang* и *Vegfa* выявлены прямые средние корреляционные связи только с геном *Notch1*. При прогрессирующем фиброзе F2A/F2B-F3A, F3A/F3B (5, 7 недель) *Ang* и *Vegfa* коррелируют с генами *Notch1* и *Tweak*, а на стадии F3B/F4 (9 недель) с геном *Tweak* связи теряются снова. Ген *Ang* на стадиях F5A/F5B, F5B-F6, F6 (11, 13 и 17 недель) связан прямыми сильными, средними и умеренными корреляционными взаимосвязями с генами *Notch1* и *Tweak*, а ген *Vegfa* образует с этими генами связи только в конце эксперимента (17 недель). На стадии F5A/F5B (11 недель) *Vegfa* связан с *Tweak*, а на стадии F6 (15 недель) — с *Notch1*.

Таким образом, при прогрессирующем венозном ангиогенезе, изменении количества междольковых вен и синусоидных капилляров,

площади междольковых вен на основании полученных данных по взаимосвязи между генами *Ang*, *Vegfa*, *Notch1*, *Tweak* можно предположить, что со стадии узловой перестройки паренхимы печени (9 недель) и до полного цирроза (17 недель) происходят изменения в молекулярных каскадах с привлечением других, не исследуемых нами генов для регуляции этих патологических процессов. Особо следует отметить, что на стадии полного цирроза (15 недель) *Ang*, *Vegfa* не задействованы в процессах патологического ангиогенеза.

В условиях физиологической нормы ни одна из выбранных нами микроРНК статистически значимо не коррелирует с генами *Ang* и *Vegfa*. На стадии F1A/F1B (3 недели) микроРНК-489-3р связана обратной умеренной связью с геном *Vegfa*. Возможно, данный ген является для нее мишенью. В период F2A/F2B-F3A (5 недель) отсутствуют связи между микроРНК и генами *Ang* и *Vegfa*. Через 7 недель эксперимента (F3A/F3B), возможно, микроРНК-489-3р снова вовлекается в патологический ангиогенез, формируя обратную среднюю корреляционную связь, но уже с геном *Ang*. Начальный этап узловой перестройки паренхимы (9 недель) сопровождается обратными умеренными и средними связями между микроРНК-489-3р, микроРНК-3558-3р и с генами *Ang* и *Vegfa*. Для стадии F5A/F5B (11 недель) характерно наибольшее количество связей между микро-

РНК и данными генами. Ген *Vegfa* устанавливает обратные и прямые сильные и средние взаимосвязи с микроРНК-489-3р, микроРНК-195-5р, микроРНК-664-3р, микроРНК-3558-3р. Обращает на себя внимание, что микроРНК-489-3р связана с двумя генами. В последующем F5B-F6 (13 недель) микроРНК-664-3р и микроРНК-489-3р связаны только с *Vegfa*, но впервые обратную умеренную и среднюю связи с генами формирует микроРНК-3085. Через 15 недель (F6) только одна микроРНК-3558-3р связана с *Ang* обратной умеренной взаимосвязью. В конце эксперимента микроРНК-195-5р связана с *Ang* и *Vegfa* прямой средней и умеренной взаимосвязью, а микроРНК-489-3р только с *Ang* обратной средней связью.

Необходимо отметить, что взаимосвязи между генами сигнальных путей Notch и TWEAK/Fn14 при патологическом ангиогенезе печени также зависят от стадии фиброза и цирроза печени.

Сопоставить полученные нами результаты с подобными в публикациях других авторов на сегодняшний день не представляется возможным, так как аналогов данного эксперимента нам не удалось обнаружить.

Заключение

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемые нами микроРНК-195-5р, микроРНК-664-3р, микроРНК-489-3р, микроРНК-3085, микроРНК-3558-3р вовлекаются в процессы перестройки внутрипеченочного сосудистого русла на разных стадиях экспериментального токсического фиброза и цирроза печени. Полученные нами данные позволяют не только раскрыть дополнительные механизмы формирования указанных состояний, но и выявить биологическую роль изученных микроРНК в прогрессировании фиброза и цирроза печени в качестве потенциальных мишеней для изучения патогенеза и разработки методов лечения. Следует отметить, что для получения более точных выводов, несомненно, необходимы дальнейшие исследования в этом направлении. Мы ожидаем, что будущие исследования с использованием новых технологий пространственной транскриптомики будут необходимы для расшифровки профилей экспрессии микроРНК и для выявления потенциальных лекарственных мишеней при фиброзе и циррозе печени.

Список литературы / References

1. Iwakiri Y, Trebicka J. Portal hypertension in cirrhosis: Pathophysiological mechanisms and therapy. *JHEP Rep.* 2021;3(4):100316. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100316>
2. Lin Y, Dong MQ, Liu ZM, Xu M, Huang ZH, Liu HJ, et al. A strategy of vascular-targeted therapy for liver fibrosis. *J Hepatology.* 2022;76(3):660-675. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.32299>
3. Ahmad A, Nawaz MI. Molecular mechanism of VEGF and its role in pathological angiogenesis. *J Cell Biochem.* 2022;123(12):1938-1965. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcb.30344>
4. Ghalehandi S, Yuzugulen J, Pranjol MdZI, Pourgholam MH. The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF. *Eur J Pharmacol.* 2023;949:175586. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175586>
5. Bauer D, Kozbial K, Schwabl P, Chromy D, Simbrunner B, Stättermayer AF, et al. Angiotensin 2 levels decrease after HCV-cure and reflect the evolution of portal hypertension. *Dig Liver Dis.* 2022;54(9):1222-1229. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dld.2022.02.013>
6. Lefere S, Van de Velde F, Hoorens A, Raevens S, Van Campenhout S, Vandierendonck A, et al. Angiotensin-2 Promotes Pathological Angiogenesis and Is a Therapeutic Target in Murine Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Hepatology.* 2019;69(3):1087-1104. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.30294>
7. Mack JJ, Iruela-Arispe ML. NOTCH regulation of the endothelial cell phenotype. *Curr Opin Hematol.* 2018;25(3):212-218. DOI: <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000425>
8. Zheng Y, Wang J, Zhao T, Wang L, Wang J. Modulation of the VEGF/AKT/eNOS signaling pathway to regulate liver angiogenesis to explore the anti-hepatic fibrosis mechanism of curcumin. *J Ethnopharmacol.* 2021;280:114480. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114480>
9. Zhang W, Han L, Wen Y, Su L, Li Y, Luo X. Electroacupuncture reverses endothelial cell death and promotes angiogenesis through the VEGF/Notch signaling pathway after focal cerebral ischemia-reperfusion injury. *Brain Behav.* 2023;13(3):e2912. DOI: <https://doi.org/10.1002/brb3.2912>
10. Wang J, Yang L, Mei J, Li Z, Huang Y, Sun H, et al. Knockdown of Notch Suppresses Epithelial-mesenchymal Transition and Induces Angiogenesis in Oral Submucous Fibrosis by Regulating TGF- β 1. *Biochem Genet.* 2023;62:1055-1069. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10528-023-10452-3>
11. Zhang Y, Zeng W, Xia Y. TWEAK/Fn14 axis is an important player in fibrosis. *J Cell Physiol.* 2021;236(5):3304-3316. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.30089>
12. Dwyer BJ, Jarman EJ, Gogoi-Tiwari J, Ferreira-Gonzalez S, Boulter L, Guest RV, et al. TWEAK/Fn14 signalling promotes cholangiocarcinoma niche formation and progression. *J Hepatol.* 2021;74(4):860-872. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.11.018>
13. Short C, Zhong A, Xu J, Mahdi E, Glazier A, Malkoff N, et al. TWEAK/FN14 promotes profibrogenic pathway activation in Prolimin-1-expressing hepatic progenitor cells in biliary atresia. *Hepatology.* 2023;77(5):1639-1653. DOI: <https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000026>
14. Li J, Gong J, Li X, Shen L, Xie Y, Zhang R. MicroRNA-34a promotes CMECs apoptosis and upregulate inflammatory cytokines, thus worsening CMECs damage and inhibiting angiogenesis by negatively targeting the Notch signaling pathway. *J Cell Biochem.* 2019;120(2):1598-1609. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcb.27433>
15. Fan J, Xu W, Nan S, Chang M, Zhang Y. MicroRNA-384-5p Promotes Endothelial Progenitor Cell Proliferation and Angiogenesis in Cerebral Ischemic Stroke through the Delta-Like Ligand 4-Mediated Notch Signaling Pathway. *Cerebrovasc Dis.* 2020;49(1):39-54. DOI: <https://doi.org/10.1159/000503950>
16. de Oliveira ARCP, Castanhole-Nunes MMU, Biselli-Chicote PM, Pavarino ÉC, da Silva RCMA, da Silva RF, et

al. Differential expression of angiogenesis-related miRNAs and VEGFA in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Arch Med Sci.* 2020;16(5):1150-1157.

DOI: <https://doi.org/10.5114/aoms.2020.97967>

17. Zhang T, Yang Y, Wang B, Wang L, Wang D, Cao N, et al. XSSJS inhibits hepatic fibrosis by promoting the miR-29b-3p/VEGFA axis in vitro and in vivo. *Biosci Rep.* 2022;42(2):BSR20212241.

DOI: <https://doi.org/10.1042/BSR20212241>

18. Lebedeva EI, Shchastny AT, Babenka AS, Zinovkin DA. Relationships between Cxcl12, Tweak, Notch1, and Yap mRNA Expression Levels in Molecular Mechanisms of Liver Fibrogenesis. *Molecular Biology.* 2024;58(1):102-111.

DOI: <https://doi.org/10.1134/S0026893324010060>

19. Chen Y, Wang X, Chen, Y. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D127-D131.

DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz757>

20. Lebedeva EI, Babenka AS, Shchastny AT. The dynamics of microRNAs level associated with pathological venous angiogenesis in experimental toxic liver fibrosis in rats. *Genes &*

Cells. 2024;19(1):181-199.

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc622891>

21. Лебедева ЕИ, Красочко ПА, Щастный АТ. Бабенко АС, Ковалев НА. Борисовец ДС. Рекомендации по оценке прогрессирования и регресса токсического фиброза печени в доклинических исследованиях. Минск: РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», 2023. 8 с.

Lebedeva EI, Krasochko PA, Shchastny AT, Babenka AS, Kovalev NA, Borisovets DS. Recommendations for assessing the progression and regression of toxic liver fibrosis in preclinical studies. Minsk: "Institute of Experimental Veterinary Medicine named after S.N. Vyshellesskogo", 2023. 8 p. (In Russ.).

22. Wilhelm A, Shepherd EL, Amatucci A, Munir M, Reynolds G, Humphreys E, et al. Interaction of TWEAK with Fn14 leads to the progression of fibrotic liver disease by directly modulating hepatic stellate cell proliferation. *J Pathol.* 2016;239(1):109-121.

DOI: <https://doi.org/10.1002/path.4707>

23. Androvic P, Valihrach L, Elling J, Sjoback R, Kubista M. Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(15):e144.

DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx588>

Информация об авторах / Information about the authors

Лебедева Елена Ивановна, к.б.н., доцент, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Витебск, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1309-4248>

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

Щастный Анатолий Тадеушевич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой госпитальной хирургии с курсом ФПКП, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Витебск, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2796-4240>

e-mail: rectorvsmu@gmail.com

Бабенко Андрей Сергеевич, к.х.н., доцент, доцент кафедры общей химии, УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5513-970X>

e-mail: labmdbt@gmail.com

Зиновкин Дмитрий Александрович, к.б.н., доцент, доцент кафедры патологической анатомии, УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3808-8832>

e-mail: zinovkin_da@gsmu.by

Надыров Эльдар Аркадьевич, к.м.н., доцент, доцент кафедры патологической анатомии, УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0896-5611>

e-mail: nadyrov2006@rambler.ru

Elena I. Lebedeva, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor at the Department of Histology, Cytology and Embryology Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1309-4248>

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

Anatoliy T. Shchastny, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Hospital Surgery with the course of Advanced Training and Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2796-4240>

e-mail: rectorvsmu@gmail.com

Andrei S. Babenka, Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor at the Department of General Chemistry, Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5513-970X>

e-mail: labmdbt@gmail.com

Dmitry A. Zinovkin, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Associate Professor at the Department of Pathology, Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3808-8832>

e-mail: zinovkin_da@gsmu.by

Eldar A. Nadyrov, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Associate Professor at the Departments of Pathological Anatomy and Histology, Cytology and Embryology, Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0896-5611>

e-mail: nadyrov2006@rambler.ru

Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Надыров Эльдар Аркадьевич

e-mail: nadyrov2006@rambler.ru

Eldar A. Nadyrov

e-mail: nadyrov2006@rambler.ru

Поступила в редакцию / Received 07.04.2024

Поступила после рецензирования / Accepted 02.05.2024

Принята к публикации / Revised 31.05.2024