

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ мРНК *TNFRSF12A* И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ *TNFRSF12A*+ КЛЕТОК В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ТИОАЦЕТАМИД-ИНДУЦИРОВАННОМ ФИБРОГЕНЕЗЕ

© 2024 г. Е. И. Лебедева^{*}, А. Т. Щастный^{*}, А. С. Бабенко^{**}

^{*}Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
просп. Фрунзе, 27, г. Витебск, 210009 Республика Беларусь

^{**}Белорусский государственный медицинский университет,
просп. Дзержинского, 83, корпус 15, г. Минск, 220116 Республика Беларусь

[@]E-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.12.2022 г.

После доработки 11.04.2023 г.

Принята к публикации 11.04.2023 г.

Впервые на разных стадиях фиброза в печени крыс детально изучены экспрессия мРНК *TNFRSF12A* и распределение *TNFRSF12A*+ клеток. В условиях физиологической нормы уровень экспрессии мРНК *TNFRSF12A* составил 0.224 (95% ДИ: 0.170–0.277). При этом клетки, экспрессирующие маркер *TNFRSF12A* практически отсутствовали. На стадии мостовидного фиброза установлен первый пик роста мРНК *TNFRSF12A* ($p = 0.000$) и площади *TNFRSF12A*+ клеток ($p = 0.000$). Второй пик подъема показателей ($p = 0.000$) выявлен в период процесса трансформации фиброза в цирроз печени, а на стадии неполного цирроза отметили резкое их падение. Со стадии достоверного цирроза снова наблюдали рост экспрессии мРНК *TNFRSF12A* и площади *TNFRSF12A*+ клеток. Иммуногистохимическим методом выявлены две группы *TNFRSF12A*+ клеток. В синусоидных капиллярах *TNFRSF12A*+ клетки имели форму близкую к плоской и напоминали эндотелиоциты, а в фиброзной соединительной ткани они были округлой формы. Количество α -SMA+ клеток до периода наступления достоверного цирроза увеличивалось плавно ($p = 0.000$), а затем происходило резкое их увеличение ($p = 0.000$).

Ключевые слова: крысы, фиброгенез печени, мРНК *TNFRSF12A*, *TNFRSF12A*+ и α -SMA+ клетки

DOI: 10.31857/S1026347024010023, **EDN:** LWFVIA

Хроническое поражение печени различной этиологии часто приводит к ее фиброзу и циррозу (Cai *et al.*, 2021; Breit *et al.*, 2021; Odagiri *et al.*, 2021). Эти патологические процессы опосредованы сложной сетью молекулярных каскадов ряда сигнальных путей (TWEAK/Fn14, Notch, WNT/ β -catenin, Hippo и др.), которые интенсивно исследуются и идентифицируются (Wilhelm *et al.*, 2016; Esmail *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2021; Dwyer *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022). К настоящему времени получен значительный объем данных о лигандах, рецепторах и генах, участвующих в формировании цирроза печени. Однако патогенез фиброза печени еще далек от полного понимания. Сообщается о необходимости проведения исследований с использованием экспериментальных животных для раскрытия клеточных, молекулярно-генетических, эпигенетических механизмов и разработки эффективных терапевтических инструментов регуляции гомеостаза при лечении

фиброза печени (Weiskirchen, 2020; Kisseleva, Brenner, 2021; Cheng *et al.*, 2021).

В мировой научной литературе имеются сведения о том, что сигнальный путь TWEAK/Fn14 может стимулировать пролиферацию фибробластов, индуцировать синтез компонентов межклеточного вещества соединительной ткани и регулировать секрецию профибротических медиаторов, тем самым поддерживая фиброгенез в таких органах, как сердце, почки, печень и мышцы. Также показано, что TWEAK/Fn14 способен регулировать ангиогенез, контролировать пролиферацию, дифференцировку, миграцию и апоптоз клеток. При поражении органов активация TWEAK/Fn14 увеличивает экспрессию провоспалительных цитокинов, запускает иммунный ответ и нарушает регуляцию процесса восстановления. Тем не менее в отношении функционирования данного сигнального пути много вопросов остается без ответа (Chen *et al.*, 2012; Gomez *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021;

Wang *et al.*, 2020; Winkles, 2008; Chen *et al.*, 2021; Dwyer *et al.*, 2021).

В печени функционирование сигнального пути TWEAK/Fn14 более подробно исследовалось при регенерации органа, гепатоцеллюлярной карциноме и лишь немногочисленные работы посвящены подробному изучению его роли в фиброгенезе органа. Показано, что при фиброзе уровни экспрессии генов сигнального пути TWEAK/Fn14 повышаются. Белок TWEAK экспрессируется преимущественно макрофагами и печеночными NK-клетками. При этом авторы не уточняют, какие именно макрофаги (звездчатые макрофаги или инфильтрирующие моноциты/макрофаги) несут маркер TWEAK (Jakubowski *et al.*, 2005; Burkly *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013;).

В изученной литературе практически отсутствуют данные о связи между уровнем экспрессии мРНК *TNFRSF12A* (Fn14), белка *TNFRSF12A* (Fn14) и α -SMA клетками (активированные жиронакапливающие клетки) в ходе инициации и развития фиброза печени. А те данные, которые представлены, не позволяют подробно рассмотреть процесс фиброгенеза поэтапно, что ограничивает возможности для соответствующих выводов.

Мы предполагаем, что увеличение количества α -SMA клеток в ходе инициации и развития фиброза печени связано с изменением уровня мРНК *TNFRSF12A* и белка *TNFRSF12A*. В соответствии с вышесказанным целью настоящей работы явилось получение данных об уровне экспрессии мРНК *TNFRSF12A*, *TNFRSF12A*-позитивных клетках и α -SMA клетках на различных стадиях фиброза печени. Наряду с этим в рамках исследования была предпринята попытка оценки потенциала уровня мРНК *TNFRSF12A* и *TNFRSF12A*-позитивных клеток в качестве маркера фиброза печени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В рамках настоящей работы использовали международные термины по цитологии и гистологии (Банин, Быков, 2009), а при описании генов применяли название терминов, принятые в Guidelines for Nomenclature of Genes, Genetic Markers, Alleles, and Mutations in Mouse and Rat (<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>).

Экспериментальное исследование выполнено на 117 крысах-самцах Wistar весом от 190–210 г. Фиброз и цирроз печени у животных индуцировали свежеприготовленным раствором тиаоацетамида (ТАА), который вводили в желудок с помощью зонда в дозе 200 мг/кг массы тела животного 2 раза в неделю в течение 17 недель. Животные случайным образом были разделены на 9 групп по

12 особей в каждой: m0 — контрольная, m1 — длительность воздействия ТАА 3 нед., m2 — длительность воздействия ТАА 5 нед., m3 — длительность воздействия ТАА 7 нед., m4 — длительность воздействия ТАА 9 нед., m5 — длительность воздействия ТАА 11 нед., m6 — длительность воздействия ТАА 13 нед., m7 — длительность воздействия ТАА 15 нед., m8 — длительность воздействия ТАА 17 нед. Крысы контрольной группы получали аналогичный объем воды без ТАА. Во время эксперимента погибло 9 животных. Протокол эксперимента был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными при учреждении образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (протокол № 6 от 03.01.2019 г). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с рекомендациями Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях от 18.03.1986, Директиве Совета ЕЭС от 24.11.1986 и рекомендациям FELASA Working Group Report (1994–1996).

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

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

Обратная транскрипция. Синтез кДНК проводили с использованием олиго (дТ) праймеров и набора реагентов ArtMMLV Total (“АртБиоТех”, Беларусь) в соответствии с инструкцией производителя.

Для одной реакции применяли одинаковое стартовое количество суммарной РНК — 200 нг/реакцию.

Метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). При выполнении ПЦР-РВ использовали реагенты производства компании “Праймтех”, Беларусь. Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл и содержал все необходимые компоненты в следующих концентрациях и количествах: 2 мМ хлорида магния, 0.1 мМ смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов, 500 нМ олигонуклеотидов, включая зонд для ПЦР-РВ, 1.25 ед. термостабильной Taq ДНК-полимеразы с соответствующим буферным раствором. Режим термоциклирования: +95°C — 2 мин, затем 40 циклов: +95°C — 5 с, +60°C — 45 с. Детекция по каналу FAM после каждого цикла. В работе использовали прибор CFX96touch (BioRad, США). Эффективность реакций определяли с помощью метода стандартной кривой и серий разведений концентрированных образцов кДНК с шагом в 5 раз. Критерием удовлетворительной эффективности считали не менее 95%. Все реакции проводили в трех повторностях. В каждой экспериментальной и контрольной группе все 12 образцов анализировали отдельно для получения наибольшей достоверности и учета внутригрупповой вариации, фенотипической гетерогенности уровня экспрессии генов. Для оценки относительно уровня мРНК *TNFRSF12A* использовали метод 2d^{Ct}.

Олигонуклеотиды. Выбор олигонуклеотидных праймеров и зондов проводили с помощью бесплатного онлайн-приложения Primer3 v. 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Уникальность и специфичность полученных олигонуклеотидов проверяли с помощью онлайн-сервиса Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Перечень выбранных молекулярных мишеней и кандидатов в референсные гены представлен в табл. 1.

В случае наличия нескольких вариантов мРНК перед началом дизайна проводили их выравнивание с помощью бесплатного программного пакета Ugene v.33 (UniPro, Россия). Для дизайна использовали консервативные участки последовательности мРНК (позволяющие анализировать все известные альтернативные сплайс-формы мРНК суммарно) с соблюдением правила о размещении одного или более олигонуклеотидов в месте соединения двух разных экзонов. Последовательности выбранных олигонуклеотидных праймеров и зондов представлены в табл. 2.

Нормализация данных ПЦР-РВ. В качестве референсного гена для нормализации данных ПЦР-РВ использовали *HES1*, характеризующийся наименьшим разбросом значений во всех экспериментальных группах. В предварительном исследовании (данные не приводятся) не обнаружили изменений

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

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

Иммуногистохимическое исследование проводили на депарафинизированных срезах (Коржевский, 2014). Использовали моноклональные кроличьи антитела к *TNFRSF12A* (FN14, номер в каталоге NBP2–67729, Bio-Techne, США, разведение 1: 200) и моноклональные мышинные антитела к α -SMA (alpha-SMA, ACTA2, номер в каталоге E-AB-22155, Wuman Elabscience Biotechnology Incorporated Company, Китай, разведение 1:1000) в соответствии с инструкциями производителей. В качестве маркера активированных жиронакапливающих клеток применяли α -SMA, так как в настоящее время он широко признан надежным индикатором их трансдифференцировки в миофибробластоподобный (активный) фенотип и является наиболее часто используемым маркером как в экспериментальных, так и в клинических исследованиях (Voutilainen *et al.*, 2020).

Для лучшей ориентации в гистологическом препарате и правильной идентификации клеток, содержащих искомый антиген, срезы докрашивали гематоксилином Майера в течение 1 мин. Для объективной интерпретации результатов для каждой исследуемой группы животных использовали положительный и отрицательный контроли. Иммуногистохимическую окраску расценивали как положительную только при отсутствии окрашивания в отрицательном контроле и, наоборот, как отрицательную при окрашивании в положительном

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

Название гена	Статус	Референсная последовательность мРНК	Кодируемый белок
TNFRSF12A	мишень	NM_181086.3	Член суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей 12A, TNF receptor superfamily member 12A
HPRT1	кандидат в референсные гены	NM_012583.2	Гипоксантин-фосфорибозилтрансфераза, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
SDHA	кандидат в референсные гены	NM_130428.1	Субъединица А флавопротеина, входящего в комплекс сукцинатдегидрогеназы, succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A
HES1*	кандидат в референсные гены	NM_024360.4	Фактор транскрипции 1 семейства bHLH (basic helix-loop-helix), hes family bHLH transcription factor 1

Примечание. * ген HES1 использован в качестве кандидата в референсные гены, поскольку в предварительных экспериментах показал высокий уровень стабильности экспрессии, первоначально рассматривался как ген-мишень.

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

Название гена	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	
TNFRSF12A	Прямой	GGATGCGCAGCAGCAC
	Обратный	CAAAACCAGGGCCAGACTAA
	Зонд	FAM–CCTGCCCACTTCAGGATGCT-BHQ1
HPRT1	Прямой	GGACAGGACTGAAAGACTTGCT
	Обратный	ACAGAGGGCCACAATGTGAT
	Зонд	FAM–CATGAAGGAGATGGGAGGCC-BHQ1
SDHA	Прямой	CCCACAGGTATCTATGGTGCT
	Обратный	TTGGCTGTTGATGAGAATGC
	Зонд	FAM–CATCACAGAAGGGTGCCGTG-BHQ1
HES1	Прямой	GAAAGATAGCTCCCGGCATT
	Обратный	CGGAGGTGCTTCACTGTTCAT
	Зонд	FAM–CCAAGCTGGAGAAGGCAGACA-BHQ1

контроле. Применяли следующие реагенты: набор 2-step plus Poly-HRP Anti Rabbit/Mouse IgG Detection System/with DAB Solution; Retrieve-All Antigen (Unmasking System Basic, США); буфер для разведения антител (BioLegend Inc., США); Tween 20 (Glenthams Life Sciences, Великобритания); PBS (Melford, Великобритания).

Морфометрический анализ. Гистологические препараты изучали с использованием компьютерных программ ImageScope Color и cellSens Standard. Определяли среднюю площадь, занимаемую TNFRSF12A-позитивными клетками

(TNFRSF12A+ клетки) в процентах к общей площади среза без учета интенсивности окраски экспрессии маркера (Guerrier *et al.*, 2014). Измерения проводили на изображениях, полученных с помощью цифровой камеры OLYMPUS XC30 (Япония) на базе микроскопа OLYMPUS BX51 (Япония) при увеличении объектива 20×. Количество α-SMA-позитивных клеток (α-SMA+ клетки) подсчитывали при увеличении объектива 40×. Анализировали не менее 3 полей зрения на каждом гистологическом срезе. Степень фиброза печени определяли согласно полуколичественной шкале Ishak K. G. (Everhart *et al.*, 2010).

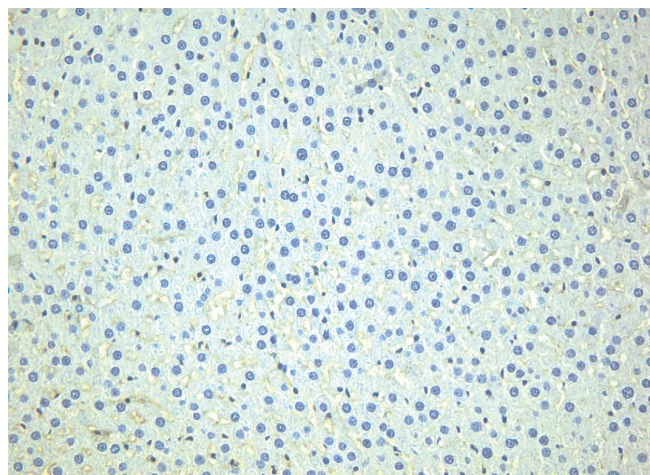


Рис. 1. Фрагмент печени крыс контрольной группы. TNFRSF12A+ клетки в паренхиме печени отсутствуют. Иммуногистохимическое выявление TNFRSF12A+ клеток и докрасивание гематоксилином Майера. Увел. об. 40×.

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

В выборках по каждой неделе эксперимента определяли нормальность частотного распределения признака по критерию Лиллиефорса. Анализ показал, что по уровню экспрессии мРНК *TNFRSF12A* в группах m2, m4, m5 и по отношению площади TNFRSF12A+ клеток к площади среза в группах m1, m2, m3, m4, m5, m6, m7 значение $p < 0.05$, следовательно, частотные распределения признака не подчинялись нормальному закону.

Количественные экспериментальные данные представлены в виде средних арифметических и их соответствующих доверительных интервалов (M (95% ДИ: $j-q$)), медианы и значения 15-го – 85-го перцентилей (Me (15%; 85%)). Об уровне статистической значимости различий изучаемых признаков в группах с нормальным распределением данных судили по t -критерию Стьюдента; в случае отличия выборок от нормального распределения использовали U -критерий Манна – Уитни. Для выявления наличия зависимости и ее силы между изучаемыми признаками использовали непараметрическую ранговую корреляцию Спирмена. Для наглядности результаты статистической обработки данных представили в виде графиков однофакторного и двухфакторного параметрического дисперсионного анализа. Так как во всех группах было одинаковое количество исследуемых признаков, допустимо использовать параметрический дисперсионный анализ (Жижин, 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

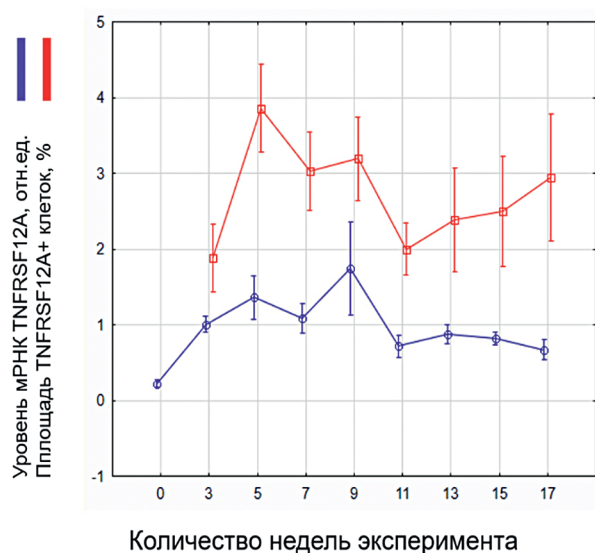
В работах авторов (Wilhelm *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2017) показано, что в условиях физиологической нормы белок *TNFRSF12A* сигнального пути TWEAK/Fn14 в клетках печени экспрессируется на весьма низком уровне. Изучение гистологических препаратов, окрашенных на выявление маркера *TNFRSF12A*, показало, что в интактной печени крыс Wistar TNFRSF12A+ клетки практически отсутствовали (рис. 1). При этом уровень экспрессии мРНК *TNFRSF12A* составил 0.224 (95% ДИ: 0.170–0.277). α -SMA+ клетки отмечались только в стенке междольковых артерий и междольковых вен. В паренхиме органа α -SMA+ клетки не наблюдались. Степень фиброза печени крыс контрольной группы по шкале Ishak K. G. соответствовала F0.

При моделировании цирроза печени на протяжении всего эксперимента анализ уровня экспрессии мРНК *TNFRSF12A* и площади TNFRSF12A+ клеток выявил их весьма сложные изменения. Для лучшей интерпретации и восприятия полученных данным вначале было принято решение разделить результаты на две большие группы (с 0 по 11 нед., с 13 по 17 нед.) и провести их анализ.

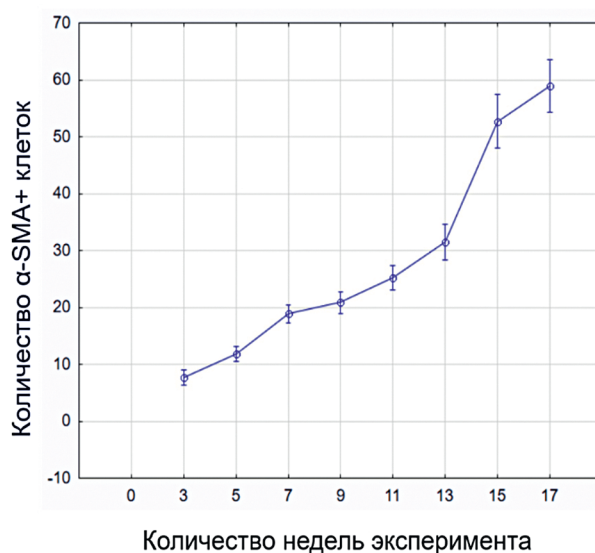
На стадии мостовидного фиброза (F3/F4, 3 нед.) выявлен первый пик роста мРНК *TNFRSF12A* и площади TNFRSF12A+ клеток (рис. 2а). Второй пик подъема показателей наблюдали в период процесса трансформации фиброза в цирроз печени (F4/F5, 9 нед.), а на стадии неполного цирроза (F5, 11 нед.) резкое их падение. При этом количество α -SMA+ клеток плавно увеличивалось (рис. 2б). Со стадии достоверного цирроза печени (F6, 13 нед.) синхронность поведения мРНК *TNFRSF12A* и площади TNFRSF12A+ клеток исчезла. Исследуемые показатели вели себя по-разному: площадь TNFRSF12A+ клеток увеличивалась, экспрессия мРНК *TNFRSF12A* росла незначительно, а при полной перестройке гистоархитектоники органа снова упала. Исчез и плавный рост количества α -SMA+ клеток. С 13 нед. эксперимента отмечено резкое увеличение их количества.

На начальном этапе эксперимента (3 нед.) в печени крыс выявили фиброзное расширение части портальных зон с отходящими от них неполными тонкими соединительнотканными септами (портальный фиброз, степень F1). Установили рост уровня мРНК *TNFRSF12A* до 1.008 (95% ДИ: 1.440–2.338). В синусоидных капиллярах отмечали TNFRSF12A+ клетки преимущественно вытянутой формы (рис. 3а). Площадь этих клеток к общей площади гистологического среза составила 2.00% (0.000; 3.000).

При изучении ИГХ-препаратов, окрашенных на α -SMA в печеночных синусоидных, наблюдали клетки преимущественно округлой формы, экспрессирующие данный маркер (рис. 3б).



а



б

Рис. 2. Представлен график дисперсионного анализа: а — динамика изменений уровня мРНК *TNFRSF12A* и отношения площади *TNFRSF12A*+ клеток к площади среза. Представлен график двухфакторного дисперсионного анализа; б — динамика изменений количества α-SMA+ клеток в течение эксперимента.

Количество этих клеток составило 7.722 (95% ДИ: 6.426–9.017).

Через 5 нед. эксперимента в печени отмечали портальный, мостовидный, местами центроlobулярный и диффузный перипортальный фиброз. Его степень по шкале Ishak K. G. соответствовала F2/F3. Площадь *TNFRSF12A*+ клеток увеличилась до 4.00% (2.000; 6.000). Определялись они в печеночных синусоидах и по форме напоминали эндотелиоциты. Экспрессия мРНК *TNFRSF12A* составила 1.152 (0.683; 1.613). Количество α-SMA+ клеток было равным 11.777 (95% ДИ: 10.480–13.074). Клетки α-SMA+ округлой формы наблюдали преимущественно в печеночных синусоидах, а также в значительно меньшем количестве в портальных зонах, стенках междольковых артерий и междольковых вен.

По истечении 7 нед. эксперимента при прогрессировании токсического поражения печени и фиброза (F3/F4) уровень мРНК *TNFRSF12A* был равен 1.082 (95% ДИ: 0.886–1.277), площадь *TNFRSF12A*+ клеток снизилась до 3.00% (2.000; 5.000), а количество α-SMA+ клеток составило 18.888 (95% ДИ: 17.283–20.493).

На фоне дальнейшей интоксикации животных (9 нед.) выявлены обширные разрастания соединительной ткани вокруг портальных зон, местами с формированием единичных ложных печеночных долек — процесс трансформации фиброза печени в цирроз. Степень фиброза по шкале Ishak K. G. соответствовала F4/F5. При этом экспрессия

мРНК *TNFRSF12A* и площадь *TNFRSF12A*+ клеток изменилась незначительно по сравнению с 7 нед. эксперимента: 1.039 (0.692; 3.138) и 3.00% (1.000; 5.000) соответственно. Количество α-SMA+ клеток продолжало увеличиваться и стало равным 20.861 (95% ДИ: 18.958–22.763). Интересно отметить, что на данном сроке эксперимента α-SMA+ и *TNFRSF12A*+ клетки появились в соединительнотканых септах и их форма была округлой в отличие от *TNFRSF12A*+ клеток в печеночных синусоидах.

Последующие исследования показали, что через 11 нед. эксперимента в печени крыс наблюдали диффузную нодулярную перестройку паренхимы. Степень фиброза по шкале Ishak K. G. соответствовала F5 (неполный цирроз). Уровень мРНК *TNFRSF12A* понизился до 0.632 (0.423; 0.864), а площади *TNFRSF12A*+ клеток до 2.00% (1.000; 3.000). При этом количество α-SMA+ клеток стало еще больше — 25.250 (95% ДИ: 23.064–27.435).

Методом непараметрической ранговой корреляции Спирмена статистически значимая зависимость между мРНК *TNFRSF12A* и *TNFRSF12A*+ клетками, между мРНК *TNFRSF12A* и стадией фиброза, между *TNFRSF12A*+ клетками и стадией фиброза, между α-SMA+ клетками и стадией фиброза, мРНК *TNFRSF12A* и α-SMA+ клетками не установлена. При этом, как видно из представленных графиков (рис. 2), до стадии достоверного цирроза уровень экспрессии мРНК *TNFRSF12A* и площадь *TNFRSF12A*+ клеток реагируют весьма

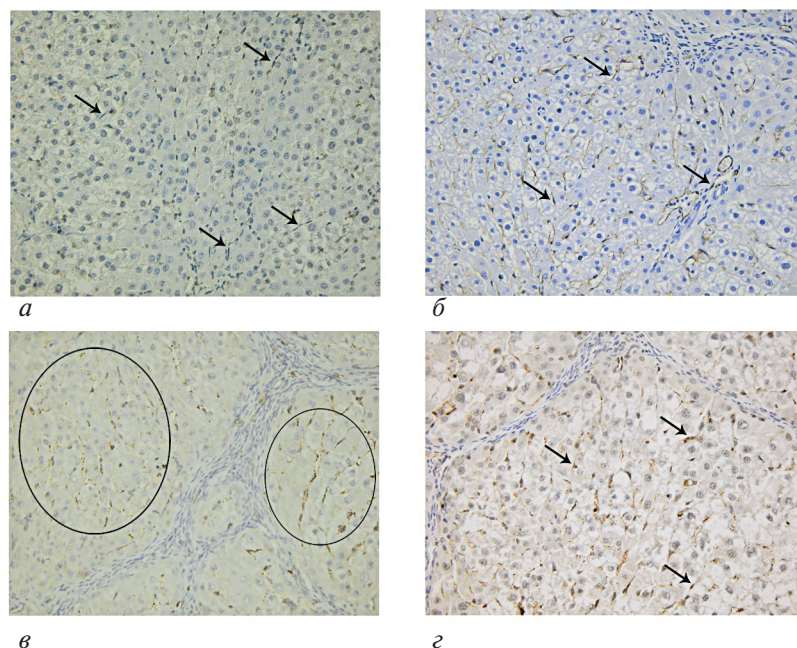


Рис. 3. Фрагменты печени крыс с индуцированным циррозом через 3 нед. (а), (б); 17 нед. (в, г) после начала эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание на *TNFRSF12A*, докраска гематоксилином Майера (а), (в). Иммуногистохимическое окрашивание на α -SMA, докраска гематоксилином Майера (б), (г). $\times 40$
TNFRSF12A⁺ клетки в синусоидных капиллярах: а — стрелки; в — выделены овальными рамками; α -SMA⁺ клетки в синусоидных капиллярах (г); б — стрелки.

схоже при фиброгенезе печени, вызванном тиоацетамидом.

На следующем этапе эксперимента (13 нед.) морфологическое исследование печени позволило установить тотальное поражение органа (достоверный цирроз, F6). Экспрессия мРНК *TNFRSF12A* была равной 0.880 (95% ДИ: 0.756–1.005), а площадь *TNFRSF12A*⁺ клеток — 2.00% (1.000; 4.000). Количество α -SMA⁺ клеток увеличилось до 31.500 (95% ДИ: 28.381–34.618). На гистологических препаратах в соединительной ткани наблюдали значительное количество α -SMA⁺ клеток округлой формы. Отмечались они и в очагах некроза гепатоцитов.

К концу эксперимента (15 нед.) установили выраженный цирроз с формированием многочисленных ложных печеночных долек. Уровень экспрессии мРНК *TNFRSF12A* изменился незначительно по сравнению с предыдущим этапом и составил 0.819 (95% ДИ: 0.732–0.905). Площадь *TNFRSF12A*⁺ клеток была равной 2.00% (1.000; 3.000). Количество α -SMA⁺ клеток выросло до 52.722 (95% ДИ: 48.067–57.377).

На терминальной стадии (17 нед.) выявили тотальное образование ложных печеночных узелков и выраженное диффузное разрастание соединительной ткани. Экспрессия мРНК *TNFRSF12A* упала до 0.672 (95% ДИ: 0.539–0.805), а площадь

TNFRSF12A⁺ клеток подросла до 2.944% (95% ДИ: 2.101–3.788). В печеночных синусоидах *TNFRSF12A*⁺ клетки имели форму близкую к плоской и напоминали эндотелиоциты (рис. 3в), а в соединительной ткани они были округлой формы. Значительное количество *TNFRSF12A*⁺ клеток выявлялось в печеночных синусоидах.

Количество α -SMA⁺ клеток через 17 нед. эксперимента составило 58.944 (95% ДИ: 54.318–63.570) (рис. 2б). Выявлялись они в стенках междольковых артерий и междольковых вен, в синусоидных капиллярах (рис. 3г), в очагах некроза гепатоцитов и в значительном количестве в соединительной ткани. Во всех структурах форма α -SMA⁺ клеток была округлой.

Рост мРНК *TNFRSF12A* и *TNFRSF12A* был отмечен в печени людей и экспериментальных животных при фиброзе (Wilhelm *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2017). Однако авторы в основном изучали функционирование сигнального пути TWEAK/Fn14 при фиброгенезе лишь в нескольких временных точках, иногда без привязки к структуре органа. Фиброз печени — это весьма динамичный процесс, сопровождающийся одновременно регенерацией органа, компенсаторно-приспособительными механизмами и постоянно меняющимся состоянием микроокружения (Rockey, Friedman, 2021; Khan, Saxena, 2021). В рамках настоящего исследования

оценивали уровень экспрессии мРНК TNFRSF12A, отношение площади TNFRSF12A+ клеток к площади среза и количества α -SMA с учетом промежуточных стадий фиброгенеза печени (в девяти временных точках эксперимента), что позволило получить новые данные.

В условиях физиологической нормы в паренхиме печени половозрелых крыс-самцов Wistar установлен уровень экспрессии мРНК TNFRSF12A отличный от нуля при отсутствии/невозможности регистрации белка TNFRSF12A. Полученные данные согласуются с результатами других исследователей (Gomez *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021). Это может быть связано с тем, что мРНК TNFRSF12A не транслируется в белок, а нарабатывается для выполнения неизвестных и неопределенных в настоящее время функций. При этом вероятна трансляция в изоформы белка, детекция которых иммуногистохимическим методом не представляется возможной или ограничена особыми требованиями к антителам. Не исключено, что определенное количество мРНК все же транслируется в белок, однако его количество чрезвычайно низко и не детектируется. На наш взгляд, не лишено смысла и предположение о том, что определенный уровень мРНК TNFRSF12A поддерживается в норме постоянно и не транслируется далее в соответствующий белок до поступления определенных сигналов. Этот процесс может быть использован для быстрой реакции на изменение состояния внутри клеток, так как печень является основным органом, обеспечивающим метаболизм ксенобиотиков (лекарств, токсических веществ и др.) (Kisseleva, Brenner, 2021; Tadokoro *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022). Регуляция этих процессов может быть связана с микроРНК и пр. некодирующими РНК. Наконец, белок TNFRSF12A может транслироваться, но тут же транспортироваться в кровоток, что в дальнейшем может быть подтверждено или опровергнуто с помощью иммуноферментного анализа.

Несмотря на то что не выявлена корреляционная связь между экспрессией мРНК TNFRSF12A и TNFRSF12A+ клетками до перехода фиброза в цирроз печени, в поведении показателей прослеживается синхронность. На представленных выше графиках (рис. 2) четко наблюдаются подъемы и падения их уровней. На стадии трансформации фиброза в цирроз уровни мРНК TNFRSF12A и TNFRSF12A одновременно снизились и в дальнейшем показали различные векторы изменения.

В рамках исследования ставился вопрос о возможности объяснения перехода от фиброза к циррозу через белок TNFRSF12A или мРНК TNFRSF12A. Считаем, что белок TNFRSF12A более точно описывает стадии фиброза печени и может быть маркером фиброгенеза при проведении доклинических исследований с использованием антифибротических препаратов. Данные об уровне

мРНК (все возможные сплайс-варианты без выделения отдельных форм) пока не удается использовать для получения клинически значимых данных о стадиях фиброза печени. Однако полученные нами данные показывают, что уровень мРНК TNFRSF12A, вероятно, играет важную роль в инициации и развитии фиброза печени и должен рассматриваться как независимый фактор. Получение новых данных о значении альтернативных сплайс-форм гена и их роли в формировании ответа на различные повреждающие факторы может пролить свет на многие до сих пор не изученные стадии фиброгенеза печени.

Следует отметить, что для белка TNFRSF12A во всех исследуемых временных точках исследований (нед.) отмечен разброс значений от животного к животному. Для мРНК TNFRSF12A только на стадии трансформации фиброза в цирроз наблюдали значительный разброс признака. При изучении гистологических препаратов печени выявили, что в различных участках одного и того же среза переход от одной стадии фиброза к другой, как и прогрессирование патологических изменений, были выражены с различной степенью интенсивности. На морфологическом уровне гетерогенность проявлялась значительнее. На патогенез оказывают влияние индивидуальные особенности животных.

Выявлены две группы TNFRSF12A+ клеток, отличающиеся друг от друга по локализации и форме. Это могут быть разные клетки или стадии дифференцировки одной популяции клеток. В печеночных синусоидах TNFRSF12A+ клетки морфологически были схожи с эндотелиоцитами. Предположительно, в условиях фиброгенеза эндотелиоциты синусоидов экспрессируют TNFRSF12A. Сигнальный путь TWEAK/Fn14 направляет или каким-то образом оказывает влияние на процесс капилляризации синусоидов. Это объясняет рост мРНК TNFRSF12A до процесса трансформации фиброза в цирроз печени. Вероятно, затем вступают в работу другие клеточно-молекулярные механизмы на фоне меняющегося микроокружения. Цирроз сопровождается дискомплексацией печеночных долек, в местах некроза гепатоцитов разрастанием соединительной ткани, как следствие TNFRSF12A+ клетки синусоидных капилляров оказываются в соединительной ткани, изменяя свою форму и, вероятно, функции в зависимости от состояния ниши. Процесс изменения фенотипа и функций эндотелиоцитов печеночных синусоидов, вероятно, является основным и одним из первых инициаторов процесса активации жиронакапливающих клеток как основного источника синтеза компонентов межклеточного вещества соединительной ткани.

В работе авторов (Wilhelm *et al.*, 2016) упомянуто о том, что в культуре жиронакапливающие клетки

печени экспрессируют *TNFRSF12A* и пролиферируют в ответ на их стимуляцию TWEAK. В нашей работе мы не можем констатировать факт того, что α -SMA+ клетки экспрессируют белок TNFRSF12A. Локализация α -SMA+ и TNFRSF12A+ клеток одинаковая — синусоиды, а вот их форма разная. Некорректно сравнивать методы *in vitro* и *in vivo*, но и полностью воссоздать в пробирке естественное микроокружение невозможно. В рамках настоящего исследования до наступления достоверного цирроза количество α -SMA+ клеток увеличивалось плавно, а затем происходило резкое увеличение их количества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В печени интактных крыс установлен уровень экспрессии мРНК *TNFRSF12A* отличный от нуля при отсутствии/невозможности регистрации белка TNFRSF12A. В ходе эксперимента на стадиях мостовидного фиброза и трансформации фиброза в цирроз печени при плавном росте количества α -SMA+ клеток выявили резкие подъемы уровня экспрессии мРНК *TNFRSF12A* и площади TNFRSF12A+ клеток по сравнению с интактной группой. На стадии неполного цирроза печени отметили резкое падение уровня мРНК *TNFRSF12A* и площади TNFRSF12A+ клеток. Прогрессирующий достоверный цирроз сопровождался увеличением площади TNFRSF12A+ клеток при незначительном росте экспрессии мРНК *TNFRSF12A*.

Выявлены две группы TNFRSF12A+ клеток, отличающиеся друг от друга по локализации и форме. TNFRSF12A+ клетки более точно описывают стадии фиброза и могут быть использованы в качестве прогностического маркера фиброгенеза при проведении доклинических исследований антифибротических препаратов. Однако полученные нами данные показывают, что уровень мРНК *TNFRSF12A*, вероятно, играет важную роль в инициации и развитии фиброза печени и должен рассматриваться как независимый фактор.

Полученные результаты позволяют рассуждать о влиянии мРНК *TNFRSF12A* на процессы инициации и развития фиброза, а также на трансформацию жиронакапливающих клеток в миофибробластический фенотип и на прогрессирование фиброза печени.

ЭТИЧЕСКОЕ ОДОБРЕНИЕ

Протокол эксперимента одобрен на заседании комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными в образовательном учреждении «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (протокол от 3 января 2019 г. № 6).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований “Фундаментальные и прикладные науки — медицине” Министерства здравоохранения Республики Беларусь, задание 2.89 “Изучить роль экспрессии генов NOTCH- и TWEAK-сигнальных путей, участвующих в процессах пролиферации и дифференцировки клеток печени в норме и при ее токсическом поражении” (регистрационный номер 20190107).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы утверждают отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Банин В.В., Быков В.Л. Международные термины по цитологии и гистологии человека с официальным списком русских эквивалентов. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 272 с.
- Коржевский Д.Э. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии. СПб.: СпецЛит, 2014. 119 с.
- Жижин К.С. Медицинская статистика: учебное пособие. Ростов н/Д: Феникс, 2007. 160 с.
- Breit H.C., Block K.T., Winkel D.J., Gehweiler J.E., Henkel M.J., Weikert T., Stieltjes B., Boll D.T., Heye T.J. Evaluation of liver fibrosis and cirrhosis on the basis of quantitative T1 mapping: Are acute inflammation, age and liver volume confounding factors? // Eur. J. Radiol. 2021. № 141. P. 109789. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2021.109789>
- Burkly L.C., Michaelson J.S., Hahm K., Jakubowski A., Zheng T.S. TWEAKing tissue remodeling by a multifunctional cytokine: role of TWEAK/Fn14 pathway in health and disease // Cytokine. 2007. V. 40. № 1. P. 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.09.007>
- Cai J., Hu M., Chen Z., Ling Z.J. The roles and mechanisms of hypoxia in liver fibrosis // Transl. Med. 2021. V. 19. № 1. P. 186. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02854-x>
- Chen H.N., Wang D.J., Ren M.Y., Wang Q.L., Sui S.J. TWEAK/Fn14 promotes the proliferation and collagen synthesis of rat cardiac fibroblasts via the NF- κ B pathway // Mol. Biol. Rep. 2012. V. 39. № 8. P. 8231–41. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1671-3>
- Chen W., Liu Y., Chen J., Ma Y., Song Y., Cen Y., You M., Yang G. The Notch signaling pathway regulates macrophage polarization in liver diseases // Int. Immunopharmacol. 2021. № 99. P. 107938. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107938>
- Cheng D., Chai J., Wang H., Fu L., Peng S., Ni X. Hepatic macrophages: Key players in the development and

- progression of liver fibrosis // *Liver Int.* 2021. V. 41. № 10. P. 2279–2294.
<https://doi.org/10.1111/liv.14940>
- Dwyer B.J., Jarman E.J., Gogoi-Tiwari J., Ferreira-Gonzalez S., Boulter L., Guest R.V., Kendall T.J., Kurian D., Kilpatrick A.M., Robson A.J., O'Duibhir E., Man T.Y., Campana L., Starkey Lewis P.J., Wigmore S.J., Olynyk J.K., Ramm G.A., Tirnitz-Parker J.E.E., Forbes S.J. TWEAK/Fn14 signalling promotes cholangiocarcinoma niche formation and progression // *J. Hepatol.* 2021. V. 74. № 4. P. 860–872.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.11.018>
- Esmail M.M., Saeed N.M., Michel H.E., El-Naga R.N. The ameliorative effect of niclosamide on bile duct ligation induced liver fibrosis via suppression of NOTCH and Wnt pathways // *Toxicol. Lett.* 2021. № 347. P. 23–35.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.04.018>
- Everhart J.E., Wright E.C., Goodman Z.D., Dienstag J.L., Hoefs J.C., Kleiner D.E., Ghany M.G., Mills A.S., Nash S.R., Govindarajan S., Rogers T.E., Greenston J.K., Brunt E.M., Bonkovsky H.L., Morishima C., Litman H.J., Group H. ALT-C. Prognostic value of Ishak fibrosis stage: findings from the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial // *Hepatology.* 2010. V. 51. № 2. P. 585–94.
<https://doi.org/10.1002/hep.23315>
- Gomez I.G., Roach A.M., Nakagawa N., Amatucci A., Johnson B.G., Dunn K., Kelly M.C., Karaca G., Zheng T.S., Szak S., Peppiatt-Wildman C.M., Burkly L.C., Duffield J.S. TWEAK-Fn14 Signaling Activates Myofibroblasts to Drive Progression of Fibrotic Kidney Disease // *J Am Soc. Nephrol.* 2016. V. 27. № 12. P. 3639–3652.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2015111227>
- Guerrier M., Attili F., Alpini G., Glaser S. Prolonged administration of secretin to normal rats increases biliary proliferation and secretin-induced ductal secretory activity // *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 2014. V. 3. № 3. P. 118–25.
<https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.04.04>
- Jakubowski A., Ambrose C., Parr M., Lincecum J.M., Wang M.Z., Zheng T.S., Browning B., Michaelson J.S., Baetscher M., Wang B., Bissell D.M., Burkly L.C. TWEAK induces liver progenitor cell proliferation // *J. Clin. Invest.* 2005. V. 115. № 9. P. 2330–40.
<https://doi.org/10.1172/JCI23486>
- Khan S., Saxena R. Regression of Hepatic Fibrosis and Evolution of Cirrhosis: A Concise Review // *Adv. Anat. Pathol.* 2021. V. 28. № 6. P. 408–414.
<https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000312>
- Kisseleva T., Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2021. V. 18. № 3. P. 151–166.
<https://doi.org/10.1038/s41575-020-00372-7>
- Li N., Hu W.J., Shi J., Xue J., Guo W.X., Zhang Y., Guan D.X., Liu S.P., Cheng Y.Q., Wu M.C., Xie D., Liu S.R., Cheng S.Q. Roles of fibroblast growth factor-inducible 14 in hepatocellular carcinoma // *Asian Pac. J. Cancer. Prev.* 2013. V. 14. № 6. P. 3509–14.
<https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.6.3509>
- Li S., Gan L., Tian Y.J., Tian Y., Fan R.Z., Huang D., Yuan F.Y., Zhang X., Lin Y., Zhu Q.F., Tang G.H., Yan X.L., Yin S. Presegetane diterpenoids from *Euphorbia sieboldiana* as a new type of anti-liver fibrosis agents that inhibit TGF- β /Smad signaling pathway // *Bioorg. Chem.* 2021. № 114. P. 105222.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105222>
- Liu Q.W., Ying Y.M., Zhou J.X., Zhang W.J., Liu Z.X., Jia B.B., Gu H.C., Zhao C.Y., Guan X.H., Deng K.Y., Xin H.B. Human amniotic mesenchymal stem cells-derived IGFBP-3, DKK-3, and DKK-1 attenuate liver fibrosis through inhibiting hepatic stellate cell activation by blocking Wnt/ β -catenin signaling pathway in mice // *Stem. Cell Res. Ther.* 2022. V. 13. № 1. P. 224.
<https://doi.org/10.1186/s13287-022-02906-z>
- Odagiri N., Matsubara T., Sato-Matsubara M., Fujii H., Enomoto M., Kawada N. Anti-fibrotic treatments for chronic liver diseases: The present and the future // *Clin. Mol. Hepatol.* 2021. V. 27. № 3. P. 413–424.
<https://doi.org/10.3350/cmh.2020.0187>
- Rockey D.C., Friedman S.L. Fibrosis Regression After Eradication of Hepatitis C Virus: From Bench to Bedside // *Gastroenterology.* 2021. V. 160. № 5. P. 1502–1520.e1.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.09.065>
- Tadokoro T., Morishita A., Masaki T. Diagnosis and Therapeutic Management of Liver Fibrosis by MicroRNA // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 15. P. 8139.
<https://doi.org/10.3390/ijms22158139>
- Voutilainen S.H., Kosola S.K., Lohi J., Mutka A., Jahnukainen T., Pakarinen M., Jalanko H. Expression of 6 Biomarkers in Liver Grafts After Pediatric Liver Transplantation: Correlations with Histology, Biochemistry, and Outcome // *Ann Transplant.* 2020. № 25. P. e925980.
<https://doi.org/10.12659/AOT.925980>
- Wang M., Xie Z., Xu J., Feng Z. TWEAK/Fn14 axis in respiratory diseases // *Clin. Chim. Acta.* 2020. № 509. P. 139–148.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.06.007>
- Weiskirchen R. Special Issue on “Cellular and Molecular Mechanisms Underlying the Pathogenesis of Hepatic Fibrosis” // *Cells.* 2020. V. 9. № 5. P. 1105.
<https://doi.org/10.3390/cells9051105>
- Wilhelm A., Shepherd E.L., Amatucci A., Munir M., Reynolds G., Humphreys E., Resheq Y., Adams D.H., Hübner S., Burkly L.C., Weston C.J., Afford S.C. Interaction of TWEAK with Fn14 leads to the progression of fibrotic liver disease by directly modulating hepatic stellate cell proliferation // *J. Pathol.* 2016. V. 239. № 1. P. 109–21.
<https://doi.org/10.1002/path.4707>
- Winkles J.A. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting // *Nat.*

- Rev. Drug. Discov. 2008. V. 7. № 5. P. 411–25. <https://doi.org/10.1038/nrd2488>
- Zhang Y., Zeng W., Xia Y. TWEAK/Fn14 axis is an important player in fibrosis // J. Cell Physiol. 2021. V. 236. № 5. P. 3304–3316. <https://doi.org/10.1002/jcp.30089>
- Zheng L., Lv Z., Gong Z., Sheng Q., Gao Z., Zhang Y., Yu S., Zhou J., Xi Z., Wang X. Fn14 hepatic progenitor cells are associated with liver fibrosis in biliary atresia // Pediatr. Surg. Int. 2017. V. 33. № 5. P. 593–599. <https://doi.org/10.1007/s00383-017-4068-5>

***TNFRSF12A* mRNA Expression and Distribution of TNFRSF12A+ Cells in Rat Liver During Thioacetamide-induced Fibrogenesis**

Elena I. Lebedeva^{1, #}, Anatoly T. Shchastniy¹, Andrei S. Babenka²

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

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

[#]e-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru

TNFRSF12A mRNA expression and distribution of TNFRSF12A+ cells were studied in detail for the first time at different stages of fibrosis in rat liver. Under physiological conditions, the expression level of *TNFRSF12A* mRNA was 0.224 (95% CI: 0.170–0.277). At the same time, cells expressing the *TNFRSF12A* marker were practically absent. In bridging fibrosis, the first peak of *TNFRSF12A* mRNA growth ($p = 0.000$) and an increase in the area of TNFRSF12A+ cells ($p = 0.000$) was established. The second peak ($p = 0.000$) was detected during the process of transformation of fibrosis into cirrhosis. At the stage of incomplete cirrhosis, a sharp drop was noted. A subsequent increase in the expression of *TNFRSF12A* mRNA and the area of TNFRSF12A+ cells was observed from the stage of significant cirrhosis. Immunohistochemical method revealed two groups of TNFRSF12A+ cells. In the sinusoidal capillaries TNFRSF12A+, the cells had a shape close to flat and resembled endotheliocytes, while in the fibrous connective tissue they were rounded. The number of α -SMA+ cells increased gradually ($p = 0.000$) before the onset of significant cirrhosis, and then there was a sharp increase ($p = 0.000$).

Keywords: rats, liver fibrogenesis, *TNFRSF12A* mRNA, TNFRSF12A+ cells, α -SMA+ cells