

УДК [615.322:582.26]:616.36-002.17

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2023-8-2-8-18>

ВЛИЯНИЕ ФУКОКСАНТИНА НА ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ CCl₄-ИНДУЦИРОВАННОГО ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ

СЛАУТИН В.Н.^{1*}, ГРЕБНЕВ Д.Ю.^{1,2}, МАКЛАКОВА И.Ю.^{1,2}, САЗОНОВ С.В.^{1,2}, ГАВРИЛОВ И.В.^{1,2}, ГАВРИЛОВА Е.И.¹¹ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Екатеринбург, Россия²ГАУЗ Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Россия

Резюме

Актуальность. В современной концепции патогенеза фиброза печени ключевым звеном является процесс активации и дифференцировки перисинусоидальных клеток печени Ито в миофибробласты. В первую очередь, этот процесс индуцируется с помощью TGF-β – главного профиброгенного фактора роста. Ингибирование TGF-β-зависимой активации перисинусоидальных клеток печени Ито является перспективной стратегией для подавления процессов фиброгенеза в печени.

Цель. Изучение эффективности применения фукоксантина в дозе 30 мг/кг и его влияния на основные звенья патогенеза фиброза печени.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 30 аутбредных ICR/CD1 мышам, распределённых случайным образом на три группы: группу интактных животных, контрольную и экспериментальную группы. Контрольная и экспериментальная группы получали тетрахлорметан (CCl₄) внутривенно в дозе 2 мл/г в течение 6 недель 2 раза в неделю. Животные экспериментальной группы после моделирования CCl₄-индуцированного фиброза печени получали фукоксантин ежедневно *per os* через зонд в дозе 30 мг/кг в течение 5 недель. Для оценки эффективности лечения фукоксантином выполнено исследование гистологических препаратов с использованием шкалы METAVIR. Для окраски на соединительную ткань был использован краситель

Sirius Red. Иммуногистохимическим методом производился анализ количества α-SMA+ клеток, CD45+ клеток, положительно окрашенных на TIMP-1 областей. Иммуноферментным методом в гомогенате печени проведено определение TGF-β, в сыворотке крови – определение провоспалительных цитокинов – IL-1β, TNF-α. Также в исследовании оценивались биохимические показатели: АЛТ, АСТ, альбумин.

Результаты. Применение фукоксантина привело к восстановлению основных биохимических показателей сыворотки крови, снижению количества миофибробластов и уровня TIMP-1 и TGF-β, уменьшению содержания соединительной ткани. В проведенном исследовании показано, что применение фукоксантина привело к снижению уровня провоспалительных цитокинов и количества CD45+ лейкоцитов.

Заключение. Установлено, что фукоксантин в дозе 30 мг/кг обладает антифибротическим действием и снижает воспаление при фиброзе печени.

Ключевые слова: фукоксантин, фиброз печени, перисинусоидальные клетки печени Ито, миофибробласты.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источник финансирования

Собственные средства.

Для цитирования:

Слаутин В.Н., Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю., Сазонов С.В., Гаврилов И.В., Гаврилова Е.И. Влияние фукоксантина на основные механизмы развития CCl₄-индуцированного фиброза печени. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2023;8(2): 8-18. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2023-8-2-8-18>

*Корреспонденцию адресовать:

Слаутин Василий Николаевич, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3, E-mail: slautinvasilij@gmail.ru

© Слаутин В. Н. и др.

ORIGINAL RESEARCH

THE EFFECTS OF FUCOXANTHIN ON THE DEVELOPMENT OF CCl₄-INDUCED LIVER FIBROSISVASILIY N. SLAUTIN^{1*}, DMITRY YU. GREBNEV^{1,2}, IRINA YU. MAKLAKOVA^{1,2}, SERGEY V. SAZONOV^{1,2}, ILYA V. GAVRILOV^{1,2}, ELENA I. GAVRILOVA¹¹Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation²Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract

Background. According to current concepts regarding hepatic fibrosis, myofibroblast differentiation from stellate cells, regulated by transforming growth factor- β (TGF- β), is a key step in its pathogenesis. Hence, inhibition of TGF- β -dependent activation of hepatic stellate cells has been suggested as a promising strategy for preventing the disease development.

Aim. To explore whether the administration of fucoxanthin at a dose of 30 mg/kg is efficient in suppressing hepatic fibrosis.

Materials and Methods. The experiments were carried out on 30 outbred ICR/CD1 mice which have been divided into three groups: intact animals, animals with untreated hepatic fibrosis which has been induced by intraperitoneal injections of CCl₄ (2 μ l/g, 6 weeks, twice per week), and animals which received fucoxanthin *per os* (30 mg/kg daily for 5 weeks) after inducing hepatic fibrosis as described above. Histological examination was performed by Sirius Red staining using the METAVIR fibrosis and activity score. Immunohistochemical analysis was performed by quantitation of α -SMA-positive myofibroblasts,

CD45-positive leukocytes, and TIMP-1-positive regions. Further, we quantified TGF- β in liver homogenate as well as interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the serum by means of enzyme-linked immunosorbent assay. An assessment of liver function was conducted by measuring serum alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and albumin levels.

Results. Fucoxanthin decreased the number of myofibroblasts and leukocytes, the volume of connective tissue and TIMP-1-positive regions, and the level of TGF- β in the liver homogenate, altogether indicative of ameliorated hepatic fibrosis. In accord, treatment with fucoxanthin reduced serum IL-1 β , TNF- α , alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase, and increased serum albumin.

Conclusion. Treatment with fucoxanthin at a dose of 30 mg/kg has an antifibrotic effect and diminishes liver fibrosis.

Keywords: Fucoxanthin, liver fibrosis, hepatic stellate cells, myofibroblasts.

Conflict of Interest

None declared.

Funding

There was no funding for this project.

◀ English

For citation:

Vasiliy N. Slautin, Dmitry Yu. Grebnev, Irina Yu. Maklakova, Sergey V. Sazonov, Ilya V. Gavrilov, Elena I. Gavrilova. The effect of fucoxanthin on the development of CCl₄-induced liver fibrosis. *Fundamental and Clinical Medicine*. (In Russ.). 2023;8(2): 8-18. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2023-8-2-8-18>

***Corresponding author:**

Dr. Vasiliy N. Slautin, 3, Repina Street, Yekaterinburg, Russian Federation, E-mail: slautinvasilij@gmail.ru

© Vasiliy N. Slautin, et al.

Введение

Известно, что развитие фиброза печени происходит вследствие длительного воздействия различных патологических факторов на печень, включая вирусные гепатиты В и С, токсические, лекарственные, алкогольные воздействия и др. [1]. В соответствии с современной концепцией фиброза печени основным источником профиброгенных миофиibroбластов, от-

ветственных за развитие фиброза, являются перисинусоидальные клетки печени Ито. По разным оценкам, их вклад в общий пул миофиibroбластов составляет от 82 до 96% [2].

Миофиibroбласты ответственны за нарушение физиологического состояния внеклеточного матрикса. Они вырабатывают избыточное количество соединительной ткани, в первую очередь коллагена I типа. Более того, они

синтезируют фермент, тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ-1 (TIMP-1), подавляющий активность других ферментов (матриксных металлопротеиназ), действие которых направлено на разрушение избыточно-синтезированного внеклеточного матрикса [3].

Перисинусоидальные клетки печени Ито способны активироваться в миофибробласты под действием различных факторов роста, цитокинов и активных форм кислорода, выделяемых при повреждении печени. Кроме перисинусоидальных клеток печени Ито, потенциально в миофибробласты способны дифференцироваться портальные фибробласты и мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки печени [4, 5].

Ключевым фактором роста, участвующим в процессе активации перисинусоидальных клеток печени Ито, является трансформирующий фактор роста- β (TGF- β), который реализует своё действие преимущественно через канонический (TGF- β /Smad) сигнальный путь [6, 7]. TGF- β связывается с рецептором на поверхности клеток (TGF β -RI) и передаёт сигнал через систему цитоплазматических белков SMAD, которые транслоцируются в ядро и запускают синтез соединительной ткани и TIMP-1 [8]. Ингибирование данного сигнального пути является перспективным направлением для подавления активации перисинусоидальных клеток печени Ито, подавления процессов фиброгенеза [9].

В недавнем исследовании, проведённом на культуре клеток печени Ито, было установлено, что фукоксантин способен подавлять активацию перисинусоидальных клеток печени Ито через блокирование канонического пути TGF- β [10]. Дальнейшие исследования позволили установить влияние фукоксантина на энергетический обмен при активации клеток печени Ито, реализующееся через ингибирование в них митохондриального дыхания [11].

Фукоксантин – вещество, относящееся к группе каротиноидов. Благодаря особенностям химической структуры каротиноиды обладают выраженными антиоксидантными, противовоспалительными, геропротекторными и гепатопротекторными свойствами [12, 13, 14, 15].

Цель исследования

Изучение возможности и перспективности использования фукоксантина в дозе 30 мг/кг при фиброзе печени.

Материалы и методы

Для проведения исследования были использованы 30 аутбредных ICR/CD1 самцов мышей в возрасте 8–10 недель (массой 20–22 г). Дизайн исследования был одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол №11 от 24.12.2021).

В настоящем исследовании лабораторные животные были случайным образом распределены на три группы: группу интактных животных, группу контроля и экспериментальную группу.

Группе интактных животных не производилось моделирование фиброза печени тетрахлорметаном (CCl₄) и введение фукоксантина.

Лабораторные животные группы контроля получали тетрахлорметан (CCl₄) внутрибрюшинно в дозе 2 мкл/г, в течение 6 недель без последующего введения фукоксантина. Тетрахлорметан был разведён на персиковом масле в соотношении 1:4. Методика моделирования CCl₄-индуцированного фиброза печени была описана нами ранее [16]. Вывод из эксперимента животных данной группы проводили через 5 недель после последней инъекции.

Животные экспериментальной группы после моделирования фиброза печени тетрахлорметаном, проведённого аналогично группе контроля, получали фукоксантин (Sigma-Aldrich, США) в дозе 30 мг/кг per os через зонд внутрижелудочно в течение 5 недель после прекращения введения CCl₄. Доза фукоксантина была выбрана на основании исследования, проведённого ранее [17]. Также выбор дозы фукоксантина проведён с учётом данных, представленных в исследованиях по изучению биодоступности и метаболизма фукоксантина [18, 19, 20].

Схема эксперимента представлена на рисунке 1.

Все животные выводились из эксперимента методом цервикальной дислокации.

Для гистологического исследования из левой доли печени были взяты кусочки органа размером 10x10x5 мм, которые фиксировались в 10% растворе нейтрального забуференного формалина («Ретиноиды», Россия), и далее изготавливались гистологические срезы толщиной 3-5 мкм. Была использована стандартная проводка гистологических срезов с использованием гистопроцессора Excelsior ES (Thermo Scientific, США).

I. Интакт
/ intactII. Контроль
/ controlIII. Эксперимент
/ experiment

6 недель / 6 weeks

Fucoxanthin 30 mg/kg

5 недель / 5 weeks

Рисунок 1.
Дизайн исследования. Группы лабора-
торных животных.

Figure 1.
Study design. Groups of laboratory animals.

Окраска на содержание коллагена в печени проводилась с использованием набора Picro Sirius Red Stain Kit (Abcam, Великобритания; кат. № ab150681). В каждом гистологическом препарате печени было проанализировано 15 областей площадью по 0,28 мм². Общая распространённость фиброза в печени была выражена в процентах и определена как отношение окрашенной области (соединительная ткань) к общей площади анализируемого препарата. Итоговое значение общей выраженности фиброза определялось как среднее значение \pm стандартное отклонение в 15 областях. Для анализа микрофотографий использована морфометрическая программа SIAMS 800 (ООО «Сиамс», Россия).

Для оценки выраженности фиброза печени в гистологических препаратах использовалась шкала METAVIR (meta-analysis of histological activity in viral hepatitis). Микропрепараты от каждого экспериментального животного исследовались с использованием светового микроскопа Axio Scope.A1, объектив микроскопа x20 (Carl Zeiss, Германия) и камеры для микроскопа AxioCam 208 (Carl Zeiss, Германия).

Для оценки биохимических показателей сыворотки крови у всех лабораторных животных, участвующих в эксперименте, производился пункционный забор крови из левого желудочка под общей зоветил-ксилазиновой (15+5 мг/кг) анестезией с использованием шприца объемом 2 мл и диаметром иглы 23G с дальнейшим помещением сыворотки в пробирки объемом 1 мл (CAT Serum Clot Activator, Grenier, Австрия, кат. № 450531). После центрифугирования крови (1000 g в течение 15 минут при температуре 4 °C) образцы сыворотки были заморожены при -40 °C.

Для проведения биохимических исследований использовалась единожды замороженная сыворотка крови. Для оценки CCL₄-индуцированной дисфункции печени определяли сывороточную активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ). Для оценки белок-синтетической функции определяли уровень альбумина. Определение данных показателей проводилось с использованием автоматического биохимического анализатора Chem Well 2910 (Combi, США).

Для проведения иммуногистохимических исследований гистологических препаратов проводилась их депарафинизация, блокирование эндогенной пероксидазной активности с использованием набора Hydrogen Peroxide Blocking Reagent (Abcam, Великобритания; кат. № ab64218), демаскировка антигена была выполнена путём применения цитратного буфера pH 6,0.

Гистологические препараты инкубировали с первичными кроличьими специфическими антителами к мышши (Abcam, Великобритания) в течение 12 часов при температуре +4 °C:

1. TIMP1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1, тканевой ингибитор металлопротеиназ-1; Anti-TIMP1 antibody), 1: 500 (Abcam, Великобритания; кат. № ab 216432). Демаскировка антигена выполнена с использованием

2. α -SMA (Alpha-smooth muscle actin, альфа гладкомышечный актин; Recombinant Anti-alpha smooth muscle Actin antibody, clone EPR5368), 1: 1000 (Abcam, Великобритания; кат. № ab124964-100).

Срезы инкубировали с вторичными антителами при комнатной температуре в течение 2 часов (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP), 1: 500), (Abcam,

Великобритания; кат. № ab97051). Для выполнения иммуногистохимических исследований была использована система детекции с субстратом пероксидазы (DAB Substrate Kit, набор для приготовления рабочего раствора диаминобензидина, Abcam, Великобритания; кат. № ab 64238-60). Окраска ядер клеток гистологического препарата была проведена с использованием гематоксилина Майера (Avantor, Нидерланды).

Подсчёт площади положительно окрашенной на TIMP-1 области и α -SMA положительно-окрашенных клеток производился в 15 областях площадью по 0,28 мм² (объектив x20).

Для проведения флюоресцентной иммуногистохимии гистологические препараты инкубировали со специфическими антителами к мышечным CD 45 (CD45R (RA3-6B2) FITC, 1: 100 (Santa Cruz Biotech, США; кат. № sc-19597) в течение 12 часов при температуре +4 °C. Визуализация ядер клеток обеспечивалась применением раствора DAPI / Antifade solution (Millipore, США; кат. № S7113). Гистологические препараты печени анализировались с помощью флуоресцентного микроскопа Axioscope 5, объектив микроскопа x20 (Carl Zeiss, Германия), камеры для микроскопа AxioCam 305 color (Carl Zeiss, Германия). Подсчёт клеток, положительных по CD45, в каждом гистологическом препарате производился в 15 областях площадью по 0,28 мм².

Методом иммуноферментного анализа проводилось определение уровней провоспалительных цитокинов: интерлейкина-1 β (ELISA Kit for interleukin 1 Beta (Cloud-Clone Corp, Китай; кат. № SEA563Mu), фактора некроза опухоли- α (ELISA Kit for Tumor Necrosis Factor Alpha (Cloud-Clone Corp, Китай; кат. № SEA133Mu) в сыворотке кро-

ви и уровня TGF- β в гомогенате печени (Mouse TGF beta 1 ELISA Kit (Abcam, Великобритания; кат. № 119557). Определение данных показателей проводилось с использованием автоматического иммуноферментного и биохимического анализатора Chem Well 2910 (Combi, США).

В настоящем исследовании данные были выражены в виде \pm SD. Полученные данные были проанализированы с помощью одностороннего ANOVA с последующим тестом Тьюки, а также Н-теста Краскела-Уоллиса с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.0 (программное обеспечение GraphPad, Ла-Хойя, Калифорния). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Установлено, что использование фукоксантина приводило к регрессу фиброза и снижению количества α -SMA+ миофибробластов.

Интактные животные не получали тетрахлорметан и не имели признаков развития фиброза печени. Гистологическая картина печени данной группы соответствовала 0 стадии фиброза по шкале METAVIR.

По результатам оценки выраженности фиброза печени у 80% животных контрольной группы установлено наличие третьей стадии по шкале METAVIR, остальные 20% имели вторую стадию фиброза печени.

В экспериментальной группе, животные которой получали фукоксантин, выявлено снижение на 75% количества мышечных, имевших третью стадию фиброза печени по шкале METAVIR, у 80% мышечных выявлен фиброз 2-й стадии (таблица 1).

Таблица 1.
Мыши с различными стадиями фиброза по шкале METAVIR через 5 недель после моделирования фиброза печени.

Table 1.
Mice with different stages of fibrosis on the METAVIR scale 5 weeks after modeling liver fibrosis.

Группа Group	n	Стадии фиброза печени METAVIR fibrosis score					Среднее Average ratio
		0	F1	F2	F3	F4	
Интакт Intact	10	10	0	0	0	0	0 \pm 0 [#]
Контроль Control	10	0	0	2	8	0	2,8 \pm 0,42*
Эксперимент Experiment	10	0	0	8	2	0	2,2 \pm 0,42* [#]

* – отличие от группы интактных животных, достоверно с $p < 0,05$; # – отличие от группы контроля, достоверно с $p < 0,05$.

* $p < 0.05$ as compared with intact animals
$p < 0.05$ as compared with control animals (not treated with fucoxanthin)

После 6-недельного курса введения тетрахлорметана установлено значительное увеличение площади, окрашенной на коллаген I и III типов, в группе контроля по сравнению с

группой интактных животных. В экспериментальной группе, получавшей фукоксантин, установлено снижение площади окраски на 26,1% по сравнению с группой контроля (рисунок 2).

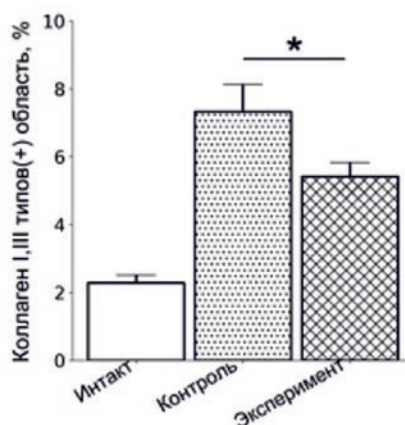
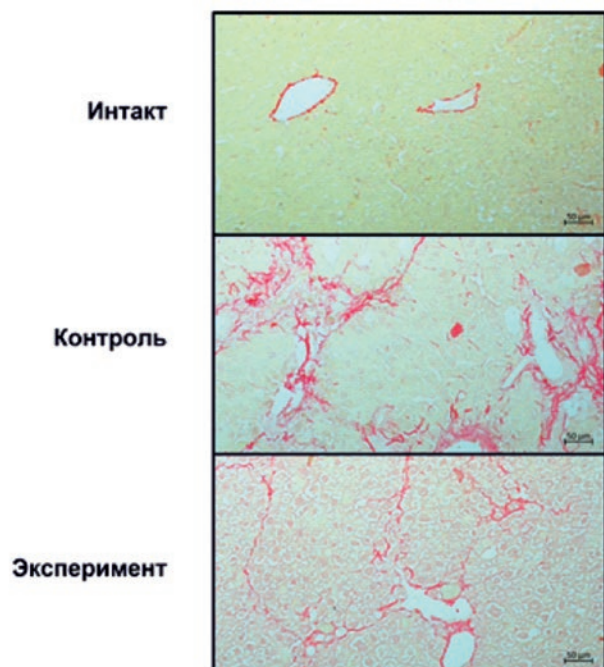


Рисунок 2.

Изменение площади окрашенной на коллаген I и III типов области. Окраска Sirius red. Объектив x20. * – отличие от группы контроля, достоверно с $p < 0,05$.

Figure 2.

Reduction of the connective tissue upon the treatment with fucoxanthin. Sirius Red staining, x200 magnification. * $p < 0.05$ as compared with control animals (not treated with fucoxanthin).

Процесс активации перисинусоидальных клеток печени Ито и дифференцировки их в α -SMA+ миофибробласты является ключевым звеном в патогенезе фиброза печени [1]. В нашем исследовании проводился подсчет количества α -SMA+ клеток. Установлено значительное повышение количества α -SMA+ миофибробластов в группе контроля по сравнению

с группой интактных животных ($p < 0,05$). В группе фукоксантина 30 мг/кг количество α -SMA+ миофибробластов снизилось на 35,8% по сравнению с группой контроля (рисунок 3).

Результаты исследования показали, что применение фукоксантина привело к снижению содержания TGF- β и TIMP-1.

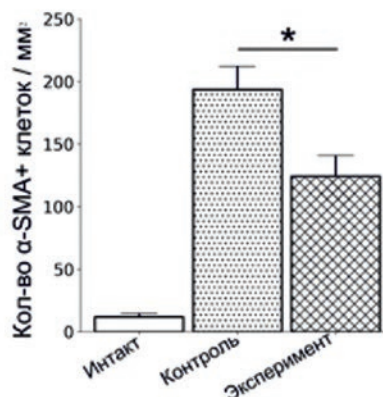
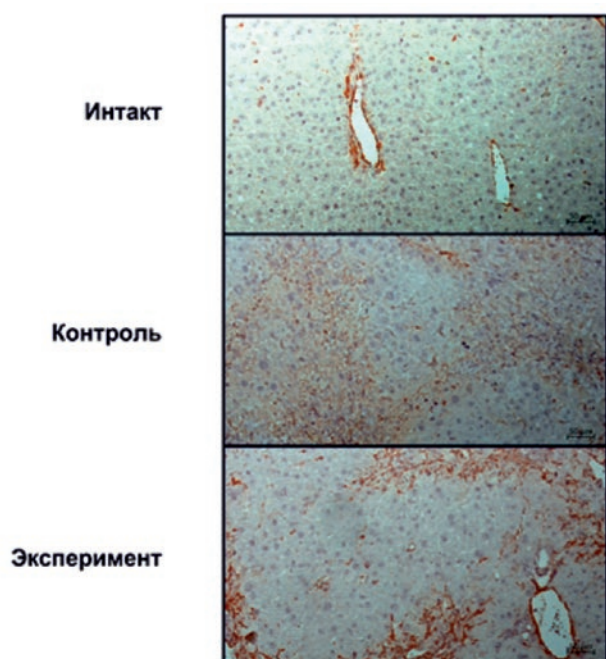


Рисунок 3.

Количество α -SMA+ миофибробластов на 1 мм². Объектив x20. * – отличие от группы контроля, достоверно с $p < 0,05$.

Figure 3.

The number of myofibroblasts (α -SMA+ positive cells) per 1 mm². Anti- α -SMA staining, x200 magnification. * $p < 0.05$ as compared with control animals (not treated with fucoxanthin).

Трансформирующий фактор роста- β является важным профиброгенным фактором роста в развитии фиброза печени, играющим ключевую роль в процессе активации перисинусоидальных клеток печени Ито [9]. Уровень TGF- β в группе контроля по сравнению с группой интактных животных значительно вырос ($p < 0,05$). Выявлено снижение уровня TGF- β в группе лабораторных животных, получавших фукоксантин в дозе 30 мг/кг на 28,37% (**рисунок 5А**).

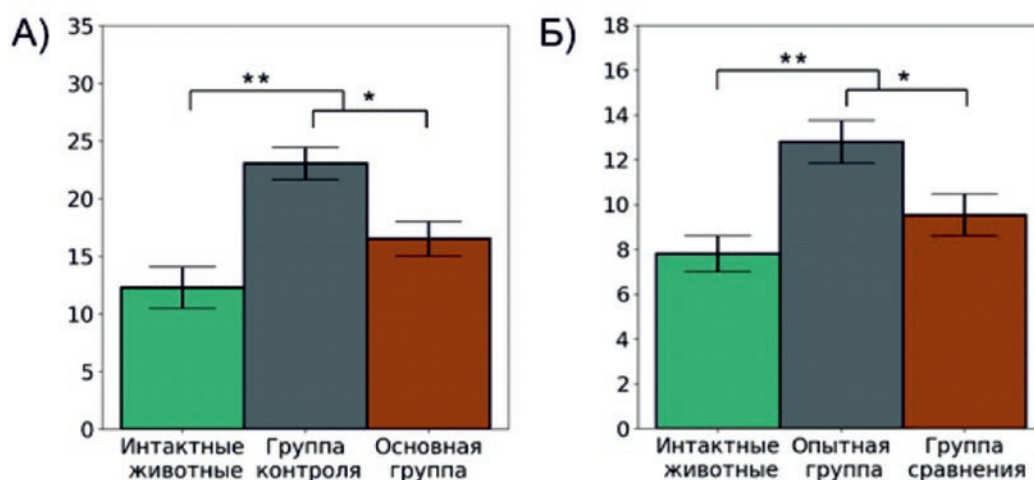
Миофибробласты способны вырабатывать тканевой ингибитор матриксных металлопро-

теиназ-1 (TIMP-1) [3], что приводит к снижению активности антифибротических ферментов – матриксных металлопротеиназ – нарушению физиологического состояния внеклеточного матрикса и смещению равновесия в сторону процессов фиброгенеза. Площадь окрашенной на TIMP-1 области в группе контроля была выше по сравнению с группой интактных животных ($p < 0,05$). Применение фукоксантина привело к снижению площади окраски на 25,45% по сравнению с группой контроля (**рисунок 4**).

Рисунок 4.

Изменение площади, окрашенной на TIMP-1 области в группах лабораторных животных. Объектив $\times 20$. * – отличие от группы контроля, достоверно с $p < 0,05$.

Figure 4.
Reduction of TIMP-1-positive area upon the treatment with fucoxanthin. Anti-TIMP-1 staining, $\times 200$ magnification. * $p < 0.05$ as compared with control animals (not treated with fucoxanthin).



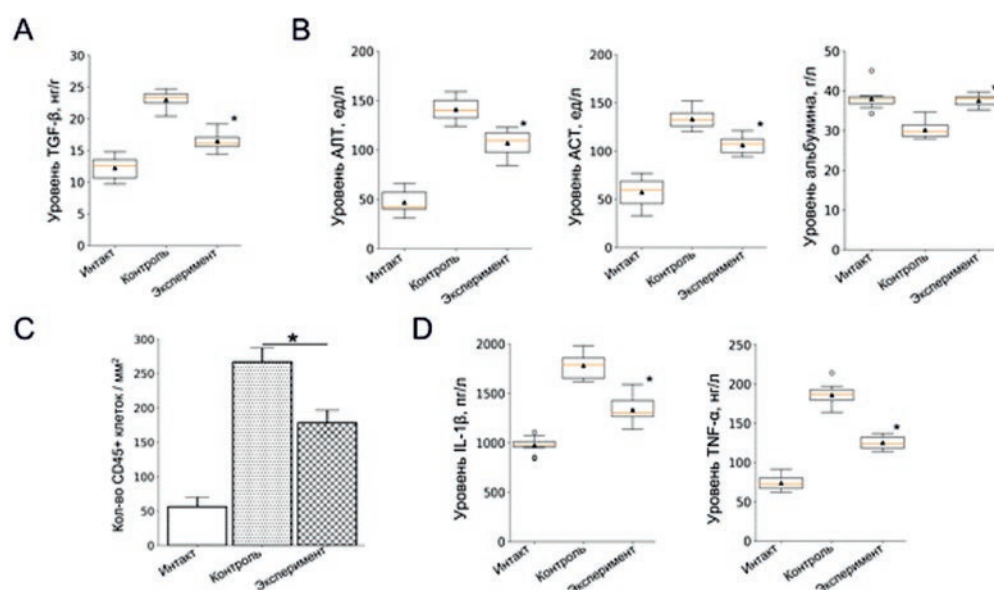
Известно, что фукоксантин подавляет активацию транскрипционного фактора NF- κ B и фосфорилирование митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК), ответственных за выработку провоспалительных цитокинов, в том числе IL-1 β , TNF- α [13, 21, 23]. В нашем исследовании при анализе данных показателей уровни IL-1 β и TNF- α повышены в группе контроля по сравнению с группой интактных животных ($p < 0,05$). У животных экспериментальной группы снижение уровней IL-1 β и TNF- α составило 25,1% и 32,76% соответственно (**рисунок 5D**).

Провоспалительные цитокины стимулируют миграцию лейкоцитов в очаг воспаления [21]. Окрашивание гистологических препаратов печени на панлейкоцитарный маркер CD45 выявило повышенное содержание CD45+ клеток в группе контрольных животных, которым вводили тетрахлорметан, в сравнении с интактными животными. Было установлено, что содержание CD45+ клеток значительно увеличилось

в группе контроля по сравнению с группой интактных животных. В экспериментальной группе снижение количества лейкоцитов составило 33,27% по сравнению с группой контроля (**рисунок 5C**).

АЛТ и АСТ являются биомаркерами повреждения клеток печени. По сравнению с группой интактных животных активность АЛТ и АСТ была значительно выше в группе контроля ($p < 0,05$). При сравнении с группой контроля уровни АЛТ и АСТ в экспериментальной группе снизились на 24% и 20,12% соответственно (**рисунок 5B**).

При анализе содержания альбумина в сыворотке крови было выявлено снижение данного показателя в группе контроля по сравнению с группой интактных животных ($p < 0,05$). В группе лабораторных животных, получавших фукоксантин в дозе 30 мг/кг, было установлено повышение уровня альбумина на 24,42% и достижение значений уровня альбумина контрольной группы (**рисунок 5B**).

**Рисунок 5.**

Уровень TGF- β в гомогенате печени (A); биохимические показатели (АЛТ, АСТ, альбумин) в сыворотке крови мышей (B); количество лейкоцитов (CD45+ клеток) на 1 мм² (C); уровень провоспалительных цитокинов, IL-1 β и TNF- α , в сыворотке крови мышей (D).

* – отличие от группы контроля, достоверно с $p < 0,05$.

Figure 5. Measurement of biomarkers of hepatic fibrosis in intact mice and animals suffering from CCL4-induced hepatic fibrosis with or without fucoxanthin treatment. (A) the level of TGF- β in liver homogenate; (B) the levels of serum alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and albumin; (C) the number of CD45+ cells per 1 mm²; (D) the level of serum IL-1 β and TNF- α . * $p < 0.05$ as compared with control animals (not treated with fucoxanthin).

Обсуждение

Известно, что вещества из группы каротиноидов обладают выраженными антиоксидантными, противовоспалительными, гепатопротекторными свойствами, что позволяет предположить их потенциальную эффективность при фиброзе печени [25]. В настоящем исследовании мы изучали возможность применения и механизмы антифибротического действия фукоксантина при фиброзе печени.

На модели CCL₄-индуцированного фиброза печени у мышей была установлена эффективность использования фукоксантина в дозе 30 мг/кг, что подтверждается восстановлением биохимических показателей сыворотки крови (АЛТ, АСТ, альбумин), уменьшением выраженности фиброза печени по шкале METAVIR, а также снижением содержания соединительной ткани. Интересно, что при применении фукоксантина в малых дозах на модели ассоциированного с диетой ожирения антифибротического действия фукоксантина выявлено не было [26]. Таким образом, можно сделать вывод о дозозависимом антифибротическом действии фукоксантина.

Активация и дифференцировка фибробластов в миофибробласты играет важную роль в заживлении ран, однако неконтролируемое течение этих процессов приводит к патологической фиброзной реакции и нарушению функции органа [3]. Перисинусоидальные клетки печени Ито являются основным источником миофибробластов при токсическом повреждении печени. Они могут быть активированы различными химическими сигналами, в том

числе с помощью активных форм кислорода, провоспалительных цитокинов, факторов роста, выделяемых из поврежденной печени [5]. Миофибробласты характеризуются экспрессией внутриклеточных филаментов (α -гладкомышечный актин, виментин), а также высокой сократительной способностью [27]. Миофибробласты являются основным источником внеклеточного матрикса при фиброзе печени, а также являются основным продуцентом тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-1, способного подавлять процессы фибролиза [3]. Таким образом, уменьшение количества миофибробластов сопровождается снижением активности процессов фиброгенеза. Установлено, что применение фукоксантина значительно снижает количество α -SMA+ миофибробластов, а также уровень тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-1.

В развитие и прогрессирование фиброза печени вовлечены различные факторы. Известно, что TGF- β – один из наиболее мощных профиброгенных цитокинов – играет решающую роль в его патогенезе, реализуя своё действие через цитоплазматический комплекс SMAD белков [7]. В более ранних работах in vitro на культуре звёздчатых клеток печени была показана способность фукоксантина ингибировать TGF- β /SMAD сигнальный путь [10]. Кроме того, при фиброзе печени основным источником TGF- β являются активированные перисинусоидальные клетки печени Ито. По результатам данного исследования, применение фукоксантина приводило к снижению уровня TGF- β .

Провоспалительные цитокины активно участвуют в развитии фиброза печени. Они стимулируют активацию и дифференцировку перисинусоидальных клеток печени Ито, индуцируют воспаление в очаге повреждения и миграцию лейкоцитов [24]. Известно, что фукоксантин обладает выраженным противовоспалительным действием, реализующимся через подавление ядерного транскрипционного фактора NF-κB и подавление процессов фосфорилирования митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) [22]. По данным, полученным в нашем исследовании, фукоксантин снижал уровни провоспалительных цитокинов и, как следствие, количество CD45⁺ лейкоцитов в печени. В исследовании, проведенном японскими учеными, также продемонстрирована способность фукоксантина оказывать противовоспалительное действие при моделировании

стеатогепатита через ингибирование окислительного стресса [28].

Заключение

В настоящем исследовании, проведенном на модели CCL₄-индуцированного фиброза печени у мышей, было впервые установлено, что фукоксантин обладает антифибротическим действием, которое реализуется через ингибирование процессов активации и дифференцировки перисинусоидальных клеток печени Ито в миофибробласты. Противовоспалительное действие фукоксантина также способствует подавлению процессов фиброгенеза. Таким образом, результаты нашего исследования демонстрируют, что использование фукоксантина в дозе 30 мг/кг является перспективным и направлено на ингибирование основных механизмов развития фиброза печени.

Литература:

1. Tan Z., Sun H., Xue T., Gan C., Liu H., Xie Y., Yao Y., Ye T. Liver Fibrosis: Therapeutic Targets and Advances in Drug Therapy. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021;9:730176. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.730176>
2. Cai X., Wang J., Wang J., Zhou Q., Yang B., He Q., Weng Q. Intercellular crosstalk of hepatic stellate cells in liver fibrosis: New insights into therapy. *Pharmacol. Res.* 2020;155:104720. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104720>
3. Pakshir P., Hinz B. The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication. *Matrix Biol.* 2018;68-69:81-93. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.019>
4. Lemoine S., Cadoret A., El Mourabit H., Thabut D., Housset C. Origins and functions of liver myofibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013;1832(7):948-954. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.02.019>
5. Puche J.E., Saiman Y., Friedman S.L. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr. Physiol.* 2013;3(4):1473-1492. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120035>
6. Barnes J.L., Gorin Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int.* 2011;79(9):944-956. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.516>
7. Pohlert D., Brenmoehl J., Löffler I., Müller C.K., Leipner C., Schultze-Mosgau S., Stallmach A., Kinne R.W., Wolf G. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009;1792(8):746-756. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.06.004>
8. Hu H.H., Chen D.Q., Wang Y.N., Feng Y.L., Cao G., Vaziri N.D., Zhao Y.Y. New insights into TGF-β/Smad signaling in tissue fibrosis. *Chem. Biol. Interact.* 2018;292:76-83. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.07.008>
9. Xu F., Liu C., Zhou D., Zhang L. TGF-β/SMAD Pathway and Its Regulation in Hepatic Fibrosis. *J. Histochem. Cytochem.* 2016;64(3):157-167. <https://doi.org/10.1369/0022155415627681>
10. Ong C.H., Tham C.L., Harith H.H., Firdaus N., Israf D.A. TGF-β-induced fibrosis: A review on the underlying mechanism and potential therapeutic strategies. *Eur. J. Pharmacol.* 2021;911:174510. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174510>
11. Kim M.B., Bae M., Hu S., Kang H., Park Y.K., Lee J.Y. Fucoxanthin exerts anti-fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019;513(3):657-662. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.052>
12. Bonet M.L., Canas J.A., Ribot J., Palou A. Carotenoids and their conversion products in the control of adipocyte function, adiposity and obesity. *Arch. Biochem. Biophys.* 2015;572:112-125. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.02.022>
13. Liu M., Li W., Chen Y., Wan X., Wang J. Fucoxanthin: A promising compound for human inflammation-related diseases. *Life Sci.* 2020;255:117850. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117850>
14. Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю., Титова Д.И., Пермьяков Н.С. Геропротекторные свойства фукоксантина. *Уральский медицинский журнал.* 2022;21(5):94-101. <https://doi.org/10.52420/2071-5943-2022-21-5-94-101>
15. Гребнев Д.Ю., Слаутин В.Н., Маклакова И.Ю., Береснева О.Ю., Конышев К.Ю. Механизмы антифибротического действия плацентарных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. *Вестник уральской медицинской академической науки.* 2022;19(4):355-364. <https://doi.org/10.22138/2500-0918-2022-19-4-355-36416>
16. Sangeetha R.K., Bhaskar N., Divakar S., Baskaran V. Bioavailability and metabolism of fucoxanthin in rats: structural characterization of metabolites by LC-MS (APCI). *Mol. Cell. Biochem.* 2010;333(1-2):299-310. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0231-1>
17. Kim K.N., Heo S.J., Yoon W.J., Kang S.M., Ahn G., Yi T.H., Jeon Y.J. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF-κB and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* 2010;649(1-3):369-375. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.032>
18. Goodman Z.D. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J. Hepatol.* 2007;47(4):598-607. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.07.006>
19. Shiratori K., Ohgami K., Ilieva I., Jin X.H., Koyama Y., Miyashita K., Yoshida K., Kase S., Ohno S. Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Exp. Eye. Res.* 2005;81(4):422-428. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.03.002>
20. Tan C.P., Hou Y.H. First evidence for the anti-inflammatory activity of fucoxanthin in high-fat-diet-induced obesity in mice and the antioxidant functions in PC12 cells. *Inflammation.* 2014;37(2):443-450. <https://doi.org/10.1007/s10753-013-9757-1>
21. Meier R.P.H., Meyer J., Montanari E., Lacotte S., Balaphas A., Muller Y.D., Clément S., Negro F., Toso C., Morel P., Buhler L.H. Interleukin-1 Receptor Antagonist Modulates Liver Inflammation and Fibrosis in Mice in a Model-Dependent Manner. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(6):1295. <https://doi.org/10.3390/ijms20061295>
22. Bae M., Kim M.B., Park Y.K., Lee J.Y. Health benefits of fucoxanthin

in the prevention of chronic diseases. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids.* 2020;1865(11):158618. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158618>

References:

1. Tan Z, Sun H, Xue T, Gan C, Liu H, Xie Y, Yao Y, Ye T. Liver Fibrosis: Therapeutic Targets and Advances in Drug Therapy. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:730176. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.730176>
2. Cai X, Wang J, Wang J, Zhou Q, Yang B, He Q, Weng Q. Intercellular crosstalk of hepatic stellate cells in liver fibrosis: New insights into therapy. *Pharmacol Res.* 2020;155:104720. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104720>
3. Pakshir P, Hinz B. The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication. *Matrix Biol.* 2018;68-69:81-93. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.019>
4. Lemoine S, Cadoret A, El Mourabit H, Thabut D, Housset C. Origins and functions of liver myofibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013;1832(7):948-954. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2013.02.019>
5. Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol.* 2013;3(4):1473-1492. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120035>
6. Barnes JL, Gorin Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int.* 2011;79(9):944-956. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.516>
7. Pohlers D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, Stallmach A, Kinne RW, Wolf G. TGF- β and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(8):746-756. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2009.06.004>
8. Hu HH, Chen DQ, Wang YN, Feng YL, Cao G, Vaziri ND, Zhao YY. New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis. *Chem Biol Interact.* 2018;292:76-83. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.07.008>
9. Xu F, Liu C, Zhou D, Zhang L. TGF- β /SMAD Pathway and Its Regulation in Hepatic Fibrosis. *J Histochem Cytochem.* 2016;64(3):157-167. <https://doi.org/10.1369/0022155415627681>
10. Ong CH, Tham CL, Harith HH, Firdaus N, Israf DA. TGF- β -induced fibrosis: A review on the underlying mechanism and potential therapeutic strategies. *Eur J Pharmacol.* 2021;911:17451 <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174510>
11. Kim MB, Bae M, Hu S, Kang H, Park YK, Lee JY. Fucoxanthin exerts anti-fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;513(3):657-662. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.052>
12. Bonet ML, Canas JA, Ribot J, Palou A. Carotenoids and their conversion products in the control of adipocyte function, adiposity and obesity. *Arch Biochem Biophys.* 2015;572:112-125. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.02.022>
13. Liu M, Li W, Chen Y, Wan X, Wang J. Fucoxanthin: A promising compound for human inflammation-related diseases. *Life Sci.* 2020;255:117850. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117850>
14. Grebnev DYU, Maklakova IYu, Titova DI, Permyakov NS. Geroprotective properties of fucoxanthin. *Ural Medical Journal.* 2022;21(5):94-101. (In Russ). <https://doi.org/10.52420/2071-5943-2022-21-5-94-101>
15. Grebnev DJu, Slautin VN, Maklakova IJu, Beresneva OY, Konyshov KY. Mechanisms of antifibrotic action of placental multipotent mesenchymal stromal cells. *Vestn Ural Med Akad Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science.* 2022;19(4):355-364. (In Russ). <https://doi.org/10.22138/2500-0918-2022-19-4-355-364>
16. Sangeetha RK, Bhaskar N, Divakar S, Baskaran V. Bioavailability and metabolism of fucoxanthin in rats: structural characterization of metabolites by LC-MS (APCI). *Mol Cell Biochem.* 2010;333(1-2):299-310. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0231-1>
17. Kim KN, Heo SJ, Yoon WJ, Kang SM, Ahn G, Yi TH, Jeon YJ. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Eur J Pharmacol.* 2010;649(1-3):369-375. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.032>
18. Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol.* 2007;47(4):598-607. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.07.006>
19. Shiratori K, Ohgami K, Ilieva I, Jin XH, Koyama Y, Miyashita K, Yoshida K, Kase S, Ohno S. Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Exp Eye Res.* 2005;81(4):422-428. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.03.002>
20. Tan CP, Hou YH. First evidence for the anti-inflammatory activity of fucoxanthin in high-fat-diet-induced obesity in mice and the antioxidant functions in PC12 cells. *Inflammation.* 2014;37(2):443-450. <https://doi.org/10.1007/s10753-013-9757-1>
21. Meier RPH, Meyer J, Montanari E, Lacotte S, Balaphas A, Muller YD, Clément S, Negro F, Toso C, Morel P, Buhler LH. Interleukin-1 Receptor Antagonist Modulates Liver Inflammation and Fibrosis in Mice in a Model-Dependent Manner. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6):1295. <https://doi.org/10.3390/ijms20061295>
22. Bae M, Kim MB, Park YK, Lee JY. Health benefits of fucoxanthin in the prevention of chronic diseases. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2020;1865(11):158618. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158618>
23. Kisseleva T, Brenner A. Inactivation of myofibroblasts during regression of liver fibrosis. *Cell Cycle.* 2013;12(3):381-382. <https://doi.org/10.4161/cc.23549>

Сведения об авторах

Слаутин Василий Николаевич, аспирант кафедры патологической физиологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (3620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3).

Вклад в статью: проведение исследования, сбор, анализ и интерпретация данных, составление текста статьи, подготовка графических элементов и иллюстрационных материалов.

ORCID: 0000-0003-3967-0442

Гребнев Дмитрий Юрьевич, доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой патологической физиологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (3620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3); старший научный сотрудник ГИЗ Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий» (620026, Россия, Екатеринбург, ул. Карла Маркса, д. 22а).

Вклад в статью: концепция и дизайн исследования, проведение исследования, сбор данных, критический пересмотр статьи на предмет важного интеллектуального содержания, утверждение окончательного варианта статьи.

ORCID: 0000-0002-5698-8404

Authors

Dr. Vasily N. Slautin, PhD Student, Department of Pathophysiology, Ural State Medical University (3, Repina Street, Yekaterinburg, 362028, Russian Federation).

Contribution: conceived and designed the study; collected and analysed the data; performed the experiments; prepared the figures; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0003-3967-0442

Dr. Dmitry Yu. Grebnev, MD, DSc, Head of the Department of Pathophysiology, Ural State Medical University (3, Repina Street, Yekaterinburg, 362028, Russian Federation); Senior Research Fellow, Institute of Medical Cell Technologies (22a, Karl Marx Street, Yekaterinburg, 620026, Russian Federation).

Contribution: conceived and designed the study; collected and analysed the data; performed the experiments; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-5698-8404

Dr. Irina Yu. Maklakova, MD, DSc, Head of the Department of Normal Physiology, Ural State Medical University (3, Repina Street,

Маклакова Ирина Юрьевна, доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (3620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3); старший научный сотрудник ГАОУ Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий» (620026, Россия, Екатеринбург, ул. Карла Маркса, д. 22а).

Вклад в статью: концепция и дизайн исследования, критический пересмотр статьи на предмет важного интеллектуального содержания.

ORCID: 0000-0002-6895-7947

Сазонов Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (3620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3); заместитель главного врача по науке ГАОУ Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий» (620026, Россия, Екатеринбург, ул. Карла Маркса, д. 22а).

Вклад в статью: критический пересмотр статьи на предмет важного интеллектуального содержания, утверждение окончательного варианта статьи.

ORCID: 0000-0001-7064-0079

Гаврилов Илья Валерьевич, кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры биохимии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (3620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3); научный сотрудник ГАОУ Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий» (620026, Россия, Екатеринбург, ул. Карла Маркса, д. 22а).

Вклад в статью: проведение биохимических исследований, критический пересмотр статьи на предмет важного интеллектуального содержания.

ORCID: 0000-0003-0806-1177

Гаврилова Елена Игоревна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (3620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3).

Вклад в статью: критический пересмотр статьи на предмет важного интеллектуального содержания.

ORCID: 0000-0003-4680-9254

Yekaterinburg, 362028, Russian Federation); Senior Research Fellow, Institute of Medical Cell Technologies (22a, Karl Marx Street, Yekaterinburg, 620026, Russian Federation).

Contribution: conceived and designed the study; wrote the manuscript.
ORCID: 0000-0002-6895-7947

Dr. Sergey V. Sazonov, MD, DSc, Head of the Department of Histology, Cytology and Embryology, Ural State Medical University (3, Repina Street, Yekaterinburg, 362028, Russian Federation); Chief Scientific Officer, Institute of Medical Cell Technologies (22a, Karl Marx Street, Yekaterinburg, 620026, Russian Federation).

Contribution: wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0001-7064-0079

Dr. Ilya V. Gavrilov, MD, PhD, Associate Professor, Department of Biochemistry, Ural State Medical University (3, Repina Street, Yekaterinburg, 362028, Russian Federation).

Contribution: performed the experiments.

ORCID: 0000-0003-0806-1177

Dr. Elena I. Gavrilova, MD, PhD, Associate Professor, Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Ural State Medical University (3, Repina Street, Yekaterinburg, 362028, Russian Federation).

Contribution: wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0003-4680-9254

Статья поступила: 03.02.2023 г.

Принята в печать: 30.05.2023 г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Received: 03.02.2023

Accepted: 30.05.2023

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.