

Стволовые и прогениторные клетки и функциональная активность печени крыс Вистар разного возраста

О.В. Першина¹, И.А. Узьянбаев¹, А.В. Пахомова¹, Э.С. Пан¹, Л.В. Когай¹, Н.Н. Ермакова¹, Л.А. Сандрикина¹, Б.К. Курбатов², В.А. Крупин¹

¹ НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга
Томского национального исследовательского медицинского центра РАН
634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

² НИИ кардиологии – филиал Томского национального исследовательского медицинского центра РАН
634012, г. Томск, ул. Киевская, 111а

Резюме

Печень имеет огромный потенциал к самовосстановлению, однако с возрастом активность процессов регенерации снижается. Происходят изменения, в том числе в функциональной активности различных клеточных популяций печени, изучение особенностей которой может стать основой для разработки новых терапевтических подходов в лечении заболеваний печени у пожилых людей. **Цель исследования** – изучить различия в содержании стволовых и прогениторных клеток и функциональной активности печени крыс разного возраста. **Материал и методы.** Эксперименты проведены на крысах Вистар в возрасте 6 и 12 месяцев. Морфологические изменения оценивали с помощью ультразвукового и гистологического исследования печени. Биохимическими методами определяли липидный спектр сыворотки крови. Цитометрическими методами исследовали поверхностные и внутриклеточные антигены стволовых и прогениторных клеток, выделенных из костного мозга, артериальной крови и печени крыс. **Результаты и их обсуждение.** У 12-месячных самцов крыс Вистар по сравнению с 6-месячными выявлено избыточное образование компонентов внеклеточного матрикса, нарушение тканевой архитектуры, развитие портальной гипертензии, а также увеличение концентрации холестерина, триглицеридов, липопротеидов высокой и низкой плотности. Обнаружены статистически значимые возрастные различия в содержании гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток, эпителиальных клеток (CD45-CD326⁺) в костном мозге, крови и печени. В паренхиме печени 12-месячных крыс оказались статистически значимо снижены популяции бипотентных предшественников гепатоцитов (CD45-CD326⁺CD133⁺), овальных клеток (CD45-CD326⁺CD133⁺CD90⁺) относительно животных в возрасте 6 месяцев. В то же время уровень всех клеточных популяций в паренхиме печени крыс, экспрессирующих внутриклеточный маркер Sox9, был статистически значимо выше у годовалых животных по сравнению с более молодыми, независимо от фенотипа клеток. **Заключение.** В печени 12-месячных крыс по сравнению с 6-месячными увеличивается количество клеток, экспрессирующих Sox9, лимфоцитов с воспалительным фенотипом, уменьшается число стволовых клеток и различных популяций эпителиальных и эндотелиальных клеток, что приводит к снижению регенераторной способности печени, нарушению тканевой архитектуры органа и изменению липидного обмена. Эти изменения во многом определяют повышенную предрасположенность к развитию хронических заболеваний печени с возрастом.

Ключевые слова: возрастные особенности, крысы Вистар, ультразвуковое исследование печени, гепатоциты, прогениторные клетки печени, Sox9.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Узьянбаев И.А., e-mail: wertyg233@gmail.com

Для цитирования: Першина О.В., Узьянбаев И.А., Пахомова А.В., Пан Э.С., Когай Л.В., Ермакова Н.Н., Сандрикина Л.А., Курбатов Б.К., Крупин В.А. Стволовые и прогениторные клетки и функциональная активность печени крыс Вистар разного возраста. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2024;44(5):95–103. doi: 10.18699/SSMJ20240511

The stem and progenitor cells and the functional activity of liver from age-different Wistar rats

O.V. Pershina¹, I.A. Uzyanbaev¹, A.V. Pakhomova¹, E.S. Pan¹, L.V. Kogay¹, N.N. Ermakova¹, L.A. Sandrikina¹, B.K. Kurbatov², V.A. Krupin¹

¹ Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine E.D. Goldberg of Tomsk National Research Medical Center of RAS

634028, Tomsk, Lenina ave., 3

² Cardiology Research Institute of Tomsk National Research Medical Center of RAS

634012, Tomsk, Kievskaya st., 111a

Abstract

The liver has a big potential for self-healing, but the activity of regeneration decreases with age. Changes are occurring, including in the functional activity of various liver cell populations, the study of the characteristics of which can become the basis for the development of new therapeutic approaches to the liver diseases treatment at older people. The aim of this research was to study the level of stem and progenitor cells and the functional activity of the healthy liver from age-different rats. **Material and methods.** Experiments were carried out on Wistar rats aged 6 and 12 months. Ultrasound and histological examination of the liver from rats was used to assess morphological changes. The lipid profile of blood serum was evaluated by biochemical methods. Cytometric methods were used to study the surface and intracellular antigens of stem and progenitor cells isolated from the bone marrow, arterial blood and liver of rats. **Results and discussion.** In 12-month-old male Wistar rats, compared with 6-month-old rats, excessive formation of extracellular matrix components, disruption of tissue architecture, development of portal hypertension, as well as an increase in the concentration of cholesterol, triglycerides, high- and low-density lipoproteins were revealed. We identified age-related differences in the content of hematopoietic and mesenchymal stem cells, epithelial cells (CD45-CD326⁺) in the bone marrow, blood and liver of rats. In the liver parenchyma, the populations of hepatocyte precursors (CD45-CD326⁺CD133⁺), oval cells (CD45-CD326⁺CD133⁺CD90⁺). At the same time, the level of all cell populations in the liver parenchyma of rats expressing the intracellular marker Sox9 was higher in one-year-old animals compared to younger ones, regardless of the cell phenotype. **Conclusions.** In the liver of 12-month-old rats, compared to 6-month-old rats, the number of cells expressing Sox9, lymphocytes with an inflammatory phenotype increases, the number of stem cells and various populations of epithelial and endothelial cells decreases, which leads to a decrease in the regenerative capacity of the liver, disruption of the tissue architecture of the organ and changes in lipid metabolism. These changes largely determine the increased susceptibility with age to the development of chronic liver diseases.

Key words: age-related features, Wistar rats, liver ultrasound examination, hepatocytes, liver progenitor cells, Sox9.

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

Correspondence author: Uzyanbaev I.A., e-mail: wertyg233@gmail.com

Citation: Pershina O.V., Uzyanbaev I.A., Pakhomova A.V., Pan E.S., Kogay L.V., Ermakova N.N., Sandrikina L.A., Kurbatov B.K., Krupin V.A. The stem and progenitor cells and the functional activity of liver from age-different Wistar rats. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal* = *Siberian Scientific Medical Journal*. 2024;44(5):95–103. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20240511

Введение

Количество пожилых людей, в том числе с различными патологиями, постоянно увеличивается. В настоящее время активно исследуется взаимосвязь между старением и риском развития заболеваний. В частности, показано, что с возрастом в организме накапливаются как молекулярные и клеточные повреждения, так и повреждающие агенты, такие как продукты перекисного окисления липидов [1]. Печень – важнейший орган с широким спектром функций: метаболизм ксенобиотиков, синтез большого количества белков и прочих соединений и т.д. Несмотря на огромные регенераторные способности и устойчивость органа к старению, со временем даже в нем обнаруживаются признаки старения и нарушения регенерации, что в конечном итоге приводит к развитию хронических заболеваний печени [2]. До сих пор неизвестно, за счет каких

механизмов и почему на фоне уменьшения с возрастом объема печени на 20–40 % основные ее функции сохраняются на прежнем уровне. Предполагают, что у лиц старше 50 лет оно может происходить за счет уменьшения объема крови [3]. Изменения затрагивают и биохимические показатели крови, отражающие функцию органа; так, с возрастом повышается активность сывороточной γ -глутамилтрансферазы и щелочной фосфатазы, а содержание сывороточного билирубина постепенно снижается [4].

Активно исследуются маркеры клеточного старения печени, такие как накопление продуктов перекисного окисления липидов, нарушение путей апоптоза, а также способность «стареющих» гепатоцитов продуцировать провоспалительные цитокины: ИЛ-6, ФНО- α , ИЛ-8 [5]. С возрастом увеличивается количество клеток Ито с измененной морфологией [6], наблюдается утолщение и дефенестрация эндотелиальных синусоидаль-

ных клеток и изменение экспрессии некоторых эндотелиальных антигенов [7]. Существование взаимосвязи между старением и риском развития фибротических изменений паренхимы печени в настоящее время также активно исследуется. Доказано, что возраст часто является независимым фактором плохого исхода при ее заболеваниях [2]. В то же время известно, что с возрастом снижается количество гепатоцитов, вступающих в S-фазу клеточного цикла, что ведет к уменьшению способности органа к регенерации [8].

Известно, что клетки-предшественники печени представляют собой гетерогенные бипотентные стволовые клетки, которые экспрессируют маркеры желчных протоков и гепатоцитов взрослого организма, антигены эпителиальных, эндотелиальных и гемопоэтических клеток. Разница между печеночными стволовыми клетками, гепатобластами и зрелыми гепатоцитами может проявляться в содержании антигенов. Многие из широко используемых маркеров, таких как молекула адгезии эпителиальных клеток (CD326), CD133, Sox9 и остеопонтин, обнаружены как на прогениторных клетках поврежденной печени, так и на холангиоцитах и/или непаренхиматозных клетках здорового органа [9]. Еще одним потенциальным кандидатом маркеров бипотенциальных клеток-предшественников печени взрослого человека называют CD90 (Thy-1), совместная экспрессия которого с CD34, c-kit, OV6, CD326 и другими маркерами выявляет популяцию клеток-предшественников, участвующую в ее регенерации [10]. В настоящее время исследования возрастных особенностей клеточных популяций печени носят преимущественно фрагментарный характер. Понимание того, как различные клеточные популяции изменяются с возрастом и как это соотносится с изменениями в печени, может помочь в разработке более эффективных подходов к терапии ее заболеваний у пожилых людей. Таким образом, цель настоящего исследования – изучить различия в содержании стволовых и прогениторных клеток и функциональной активности печени крыс Вистар разного возраста.

Материал и методы

Эксперименты проводились на самцах крыс Вистар ($n = 20$), полученных из питомника отдела экспериментальных биологических моделей НИИ фармакологии и регенеративной медицины (НИИФиРМ) им. Е.Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра (ТНИМЦ) РАН. Возраст крыс составлял 6 ($n = 10$) и 12 месяцев ($n = 10$) и был выбран на основе продолжительности жизни крыс Вистар [11]. Животные находились в стандартных ус-

ловиях вивария НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ РАН. Эвтаназию выполняли передозировкой CO_2 . Все работы с животными проведены в строгом соответствии с уставом Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целях [12]. Содержание животных и дизайн исследования одобрены комитетом по биоэтике НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ РАН (протокол № 167A032020 от 18.05.2020).

УЗИ печени крыс выполнено на высокочастотной ультразвуковой платформе для работы с мелкими лабораторными животными *in vivo* VIVO 3100 LT (VisualSonics, Канада), его результаты анализировали в соответствии с критериями A.S. Lessa et al. [13]. После забора материалов проводили биохимическое исследование сыворотки крови с использованием автоматического биохимического анализатора AU480 (Beckman Coulter, США) и стандартных наборов фирмы Beckman Coulter. Гистологическое исследование ткани печени выполняли согласно стандартной методике [14]. Для оценки структуры органа подготовленные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, для оценки содержания соединительной ткани препараты – по Ван Гизону с определением ее относительной площади [15].

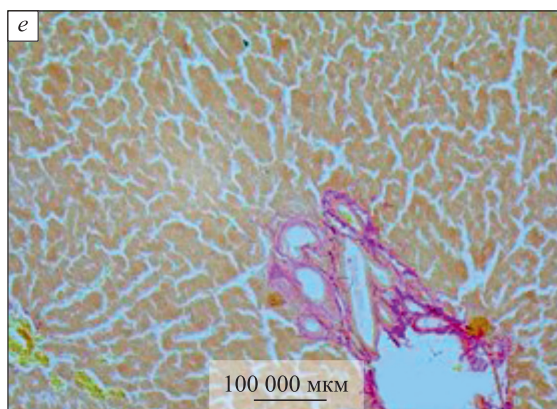
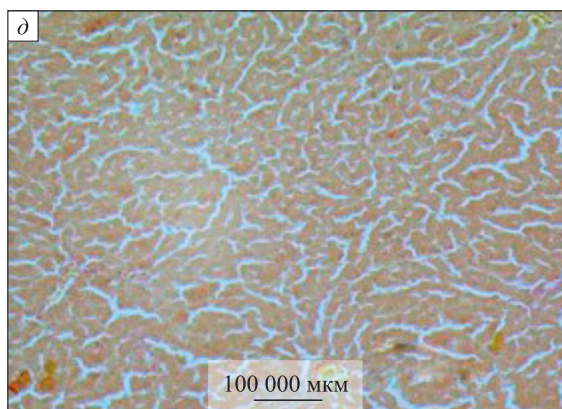
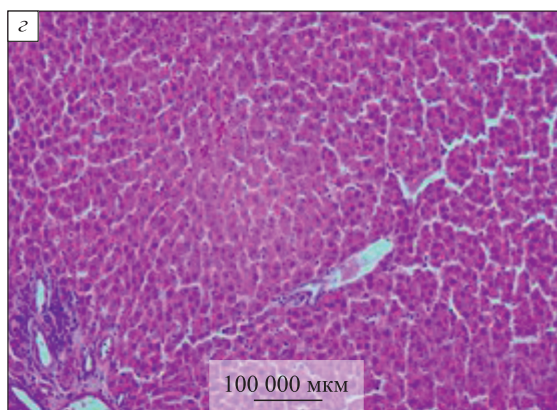
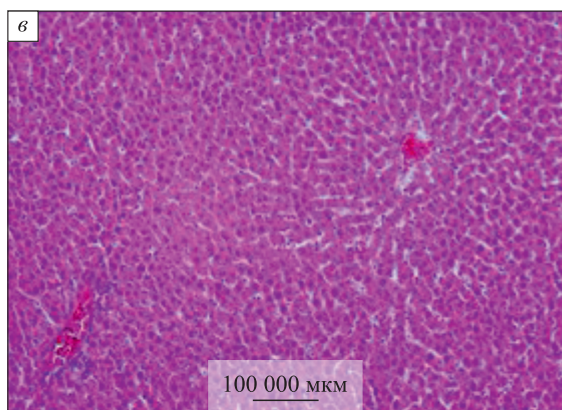
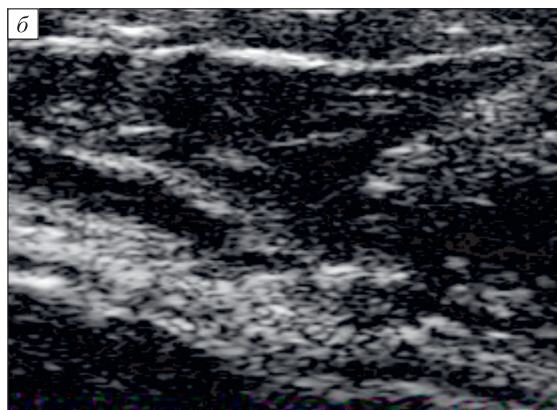
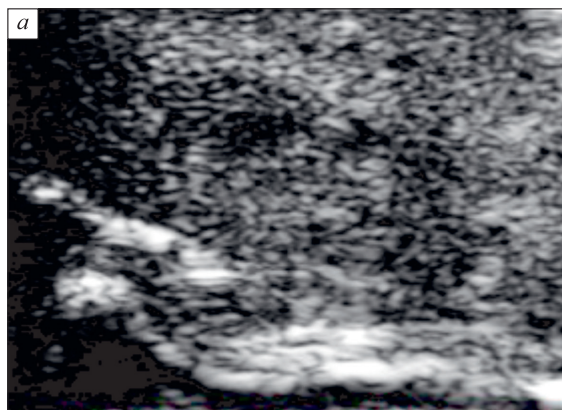
Кровь из общей сонной артерии забирали у наркотизированных животных через катетер, стабилизировали 2%-м К2ЭДТА (Sigma-Aldrich, Германия) в соотношении 20 мкл антикоагулянта на 1 мл крови. Стандартными методами получали мононуклеары из костного мозга, крови и паренхимы печени. Оценку экспрессии маркеров на мононуклеарах проводили с использованием проточного цитофлуориметра FACS Canto II с программным обеспечением FACS Diva (BD Biosciences, США). Изучали экспрессию поверхностных маркеров CD45 APC-Cy, CD90 APC (Becton Dickinson, США), CD133 Alexa Fluor® 405, CD326 Alexa Fluor® 488 (Abcam, Великобритания), OV-6 Alexa Fluor 700 (R&D Systems, США) согласно стандартным протоколам для цитометрии (разведение 1:50). После окрашивания поверхностными маркерами проводили окрашивание внутриклеточным антигеном Sox9 Alexa Fluor® 647 (Becton Dickinson) согласно инструкции производителя.

Нормальность распределения полученных данных оценивали с использованием W-теста Шапиро – Уилка. Вычисляли среднее арифметическое (M), ошибку среднего арифметического (SEM) и представляли в виде $M \pm SEM$. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

Результаты

При выполнении УЗИ выявлены визуальные различия в экоструктуре печени у животных разных возрастных групп: у более молодых крыс (6 месяцев) она была мелкозернистой (рисунок, а), тогда как у более старших (12 месяцев) – среднезернистой (рисунок, б), у которых также

наблюдалась диффузно повышенная эхогенность печени по сравнению с молодыми животными. У крыс обеих групп край печени был ровный и четко выраженный, изоэхогенные, гиперэхогенные и гипоехогенные узлы не обнаруживались. Вместе с тем у 12-месячных животных диаметр портальной вены был статистически значимо больше,



Результаты исследования печени 6-месячных (а, в, д) и 12-месячных самцов крыс Вистар (б, з, е): ультразвуковое изображение поперечного среза (а, б), гистологическая картина при окрашивании гематоксилином и эозином (в, з), пикрофуксином по Ван Гизону (д, е), $\times 100$

Results of a study of the liver of 6-month-old (a, v, d) and 12-month-old male Wistar rats (б, з, е): ultrasound image of a cross section (а, б), histological picture when stained with hematoxylin and eosin (в, з), picrofuchsin according to van Gieson (д, е), $\times 100$

чем у 6-месячных ($1,8 \pm 0,07$ и $1,2 \pm 0,06$ мм соответственно).

Печень животных независимо от возраста характеризовалась единообразием ацинарного строения во всех полях зрения (рисунок, в, з). Однако у 12-месячных крыс отмечались отдельные перипортальные лимфогистиоцитарные инфильтраты, преимущественно в центре долики встречались единичные гепатоциты в состоянии мелкокапельной жировой дистрофии (рисунок, з). Количество и относительная плотность синусоидных капилляров статистически значимо не различались. Гистологическое исследование препаратов печени, окрашенных по Ван Гизону, показало, что у 12-месячных животных (рисунок, е) по сравнению с 6-месячными (рисунок, д) отмечалось незначительное отложение фиброзной ткани вокруг портальных трактов, в отдельных случаях наблюдались тонкие междольковые соединительнотканые перегородки, при этом площадь соединительной ткани была достоверно больше (соответственно 6,7 и 0,76 %, $p = 0,000001$).

Концентрация холестерина (в 1,6 раза), триглицеридов (в 2,1 раза), липопротеинов высокой (ЛПВП) и низкой плотностей (ЛПНП, в 1,6 и 1,4 раза соответственно) у 12-месячных крыс была статистически значимо больше, чем у 6-месячных, а активность щелочной фосфатазы – в 2 раза меньше (табл. 1). При анализе популяций гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток (ГСК, CD45-CD326-CD133⁺CD90⁺; МСК, CD45-CD326-CD133-CD90⁺ соответственно) выявлено статистически значимое снижение у 12-месячных крыс содержания гемопоэтических стволовых клеток (ГСК, CD45-CD326-CD133⁺CD90⁺) в костном мозге (в 235,5 раза) по сравнению с 6-месячными (табл. 2). Тотальное истощение ГСК в костном мозге привело к их отсутствию в артериальной крови и паренхиме печени у 12-месячных крыс. Количество мезенхимальных стволовых клеток (МСК,

CD45-CD326-CD133-CD90⁺) у 12-месячных крыс было достоверно меньше в костном мозге (в 2,5 раза) и в паренхиме печени (в 24 раза) относительно более молодых животных. Подобная тенденция была характерна и для популяции эпителиальных клеток (CD45-CD326⁺), их уровень в костном мозге, в артериальной крови и паренхиме печени у 12-месячных крыс оказался соответственно в 5,0, 61,3 и 6,6 раза ниже, чем у 6-месячных, а также для циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток (CD45^{dim}CD133⁺) (в 8 раз меньше) (см. табл. 2). Исследование популяции лимфоцитов CD45^{hi} с воспалительным фенотипом выявило ее статистически значимое увеличение у 12-месячных крыс в костном мозге (в 1,8 раза), в паренхиме печени и артериальной крови значимых различий не наблюдалось (см. табл. 2).

В паренхиме печени 12-месячных крыс содержание бипотентных предшественников гепатоцитов (CD45-CD326⁺CD133⁺) и овальных клеток (CD45-CD326⁺CD133⁺CD90⁺) было соответственно в 43 и 2 раза меньше, чем у животных в возрасте 6 месяцев (табл. 3). Обращает на себя внимание тот факт, что размер всех клеточных популяций в паренхиме печени, экспрессирующих внутриклеточный маркер Sox9, был статистически значимо больше у 12-месячных животных по сравнению с 6-месячными независимо от фенотипа клеток: популяции клеток Ито (CD45-CD133⁺Sox9⁺) – в 18,7 раза, CD326⁺CD133⁺Sox9⁺ – в 10 раз, клеток каналов Геринга (CD45-CD326⁺CD133⁺Sox9⁺) – в 13 раз, диплоидных гепатоцитов перипортальной зоны Sox9⁺CD45⁻ – в 13,7 раза, незрелых холангиоцитов (CD45-CD326⁺CD133-Sox9⁺) – в 10 раз, синусоидальных эндотелиальных клеток печени (CD133⁺CD45⁺Sox9⁺) – в 6 раз (см. табл. 3). Исключение составила общая популяция гепатоцитов и холангиоцитов (CD45-CD326-CD133-Sox9⁻), уровень этих клеток также был статистически значимо выше у 12-месячных, чем у 6-месячных крыс (в 1,3

Таблица 1. Биохимические показатели крови 6- и 12-месячных самцов крыс Вистар

Table 1. Biochemical blood parameters of 6- and 12-month-old male Wistar rats

Показатель	6-месячные крысы	12-месячные крысы	p
Активность АлАТ, ед/л	33,0 ± 7,5	44,0 ± 3,95	0,21
Активность АсАТ, ед/л	140,0 ± 10,5	125,2 ± 3,4	0,19
Активность щелочной фосфатазы, ед/л	95,1 ± 9,2	47,9 ± 2,03	0,00011
Содержание билирубина общего, мкмоль/л	1,9 ± 0,7	1,2 ± 0,1	0,28
Содержание билирубина прямого, мкмоль/л	0,5 ± 0,09	0,5 ± 0,03	0,91
Содержание холестерина, ммоль/л	1,9 ± 0,2	3,0 ± 0,1	0,00021
Содержание триглицеридов, ммоль/л	0,5 ± 0,06	1,03 ± 0,04	0,000001
Содержание ЛПВП, ммоль/л	1,1 ± 0,10	1,8 ± 0,08	0,000036
Содержание ЛПНП, ммоль/л	0,7 ± 0,09	0,9 ± 0,09	0,04

Таблица 2. Содержание популяций стволовых и прогениторных клеток в костном мозге, артериальной крови и паренхиме печени 6- и 12-месячных самцов крыс Вистар, % от всех окрашенных мононуклеаров**Table 2.** Contents of stem and progenitor cells populations in the bone marrow, arterial blood and liver parenchyma of 6- and 12-month-old male Wistar rats, % of all stained mononuclears

Популяция	6-месячные крысы	12-месячные крысы	<i>p</i>
Костный мозг			
МСК	14,62 ± 0,52	5,83 ± 2,32	0,0018
Эпителиальные клетки	12,31 ± 1,67	2,39 ± 1,32	0,0002
ГСК	4,71 ± 0,54	0,02 ± 0,001	0,000001
Циркулирующие эндотелиальные прогениторные клетки	0,58 ± 0,09	0,69 ± 0,15	0,53
Лимфоциты CD45 ^{hi}	0,17 ± 0,04	0,31 ± 0,05	0,04
Артериальная кровь			
МСК	13,06 ± 5,14	13,16 ± 10,76	0,99
Эпителиальные клетки	18,49 ± 5,52	0,30 ± 0,14	0,004
ГСК	0,04 ± 0,01	0	0,000001
Циркулирующие эндотелиальные прогениторные клетки	0,87 ± 0,37	0,11 ± 0,04	0,05
Лимфоциты CD45 ^{hi}	0,51 ± 0,21	0,99 ± 0,55	0,42
Паренхима печени			
МСК	3,38 ± 1,59	0,14 ± 0,01	0,05
Эпителиальные клетки	3,54 ± 3,44	0,53 ± 0,08	0,000001
ГСК	0,01 ± 0,005	0	0,000001
Лимфоциты CD45 ^{hi}	0,17 ± 0,05	0,11 ± 0,06	0,45

раза), в то же время популяция промежуточных гепатоцитов CD45⁺CD326⁺CD133⁺Sox9⁺ – достоверно меньше (в 9,3 раза) (см. табл. 3).

Обсуждение

Старение является важным фактором риска наиболее распространенных заболеваний. Доказано, что восприимчивость к заболеваниям печени (в частности, к циррозу), а также смертность от них увеличиваются с возрастом [2]. Следует отметить, что в современной литературе практи-

чески нет данных о комплексном исследовании здоровых добровольцев или изучении на животных моделях возрастных изменений на разных уровнях одномоментно (УЗИ и гистологическая картина печени, биохимические параметры, содержание различных популяций клеток в крови, костном мозге и паренхиме печени). Нами на основании данных гистологии и УЗИ показано наличие у более старших животных изменений в печени, характерных для начала фибротического процесса: избыточное образование и отложение компонентов внеклеточного матрикса, наруше-

Таблица 3. Содержание популяций клеток в паренхиме печени 6- и 12-месячных самцов крыс Вистар, % от всех окрашенных мононуклеаров**Table 3.** Content of cell populations in the liver parenchyma of 6- and 12-month-old male Wistar rats, % of all stained mononuclears

Популяция	6-месячные крысы	12-месячные крысы	<i>p</i>
Бипотентные предшественники гепатоцитов	6,47 ± 3,88	0,15 ± 0,02	0,006
Овальные клетки	0,02 ± 0,001	0,01 ± 0,001	0,03
Клетки Ито	0,013 ± 0,004	0,243 ± 0,03	0,000001
CD326 ⁺ CD133 ⁺ Sox9 ⁺	0,12 ± 0,06	1,21 ± 0,67	0,0014
Клетки каналов Геринга	0,02 ± 0,004	0,26 ± 0,02	0,000001
Диплоидные гепатоциты перипортальной зоны	0,22 ± 0,034	3,01 ± 1,44	0,05
Незрелые холангиоциты	0	0,10 ± 0,01	0,000001
Синусоидальные эндотелиальные клетки печени	0,13 ± 0,04	0,79 ± 0,24	0,01
Общая популяция гепатоцитов и холангиоцитов	61,23 ± 1,81	81,05 ± 3,92	0,0002
Популяция промежуточных гепатоцитов	4,81 ± 2,38	0,52 ± 0,09	0,000001

ние тканевой архитектуры, развитие портальной гипертензии. Биохимический анализ крови подтвердил наличие возрастных особенностей: у 12-месячных крыс был выше уровень холестерина, триглицеридов, ЛПВП и ЛПНП, что свидетельствует о начинающихся в зрелом возрасте нарушениях жирового обмена. Следует отметить, что подобные изменения биохимических параметров отмечаются в работах, касающихся исследований более пожилых животных, в возрасте 20 месяцев и более [16]. Уменьшение активности щелочной фосфатазы у 12-месячных крыс может быть связана с ее особенностями – у молодых крыс большая часть фермента представлена костной изоформой, способствующей активному образованию костной ткани [17].

Связанные с возрастом изменения включают клеточное старение, нарушение восприятия питательных веществ, изменение функции митохондрий [18]: так, у самцов крыс Вистар с возрастом увеличивается текучесть митохондриальной мембраны гепатоцитов в области белок-липидных контактов [19]. Подобные нарушения могут приводить к истощению стволовых клеток и изменению межклеточной коммуникации. Нами показано, что у 12-месячных животных наблюдалось сокращение популяций ГСК и МСК в костном мозге и паренхиме печени, а также эпителиальных прогениторных клеток в артериальной крови, костном мозге и паренхиме печени по сравнению с более молодыми животными. Кроме того, с возрастом усиливаются морфологические и функциональные изменения МСК. В частности, МСК, выделенные из костного мозга 15-месячных животных, определяются как более распластанные и уплощенные клетки со сниженной эффективностью их активации ростовыми факторами [20].

Циркулирующие эндотелиальные прогениторные клетки играют важную роль в процессах восстановления эндотелия сосудов, занимая важную нишу в этапах регенерации тканей, в том числе ткани печени. У 12-месячных крыс количество циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток снижалось. В нормальной печени с интактной паренхимой и сосудистой сетью образование новых сосудов или ангиогенные сигналы опосредуются синусоидальными и эндотелиальными клетками [21], количество которых у 12-месячных крыс было больше, чем у 6-месячных. Исследователи давно предположили наличие в костном мозге мультипотентного эпителиального предшественника. Выявленное снижение количества стволовых предшественников эпителиальных клеток в костном мозге 12-месячных крыс относительно 6-месячных животных сопровождалось уменьшением их количества как в артериальной

крови, так и в паренхиме печени. Помимо этого, выявлено повышение в костном мозге 12-месячных крыс числа лимфоцитов с воспалительным фенотипом CD45^{hi}, что характерно для клеток, экспрессирующих CD4 и CD8 [22]. Некоторые популяции эндотелиальных клеток и циркулирующие лимфоциты CD45^{hi} способны паракринно участвовать в секреции медиаторов воспаления, провоцируя системное провоспалительное состояние [21]. Можно предположить, что выявленные в крови изменения содержания ГСК, эпителиальных и эндотелиальных клеток могут быть предикторами развития заболеваний у пожилых людей.

При анализе количества стволовых клеток, клеток-предшественников и пролиферирующих клеток непосредственно в паренхиме печени установлено уменьшение популяции овальных клеток и бипотентных предшественников гепатоцитов у 12-месячных крыс. В литературе существуют данные о снижении с возрастом их активации в ответ на повреждение, что также уменьшает способность печени к регенерации [23]. У 12-месячных крыс популяции клеток, экспрессирующих Sox9, были больше, чем у 6-месячных. Sox9, будучи ключевым фактором транскрипции, регулирующим множественные компоненты внеклеточного матрикса во время нормального развития, играет важную роль в развитии желчных протоков, в регенерации печени [24] и поврежденных органов, в опухолеобразовании, эмбриогенезе [25]. Экспрессия транскрипционного фактора увеличивается во время активации звездчатых клеток печени профибротическими сигнальными факторами, Sox9 способствует выработке компонентов внеклеточного матрикса, таких как коллаген I типа и остеопонтин [23]. Более того, в ряде исследований предлагается использовать потенциал Sox9 и зависимых от него путей в качестве биомаркеров или мишеней для уменьшения цирроза печени, снижения хронического воспаления печени [19]. Возрастное увеличение содержания клеток Ито и эндотелиальных клеток синусоидов печени также связывают с активацией процессов фиброобразования с возрастом [26, 27]. В частности, показано, что у крыс в возрасте 20 месяцев наряду со снижением количества и активности гепатоцитов наблюдалась псевдокапилляризация синусоидных эндотелиальных клеток печени и увеличение количества клеток Ито [28].

В совокупности полученные результаты об изменении как клеточного состава костного мозга, крови и печени, так и особенностей работы печени подтверждают данные, согласно которым с возрастом активируются процессы воспаления и фиброобразования. В конечном итоге возрастные изменения накладывают отпечаток на функционирование печени, что хорошо прослеживается

по показателям биохимического анализа крови. Показатели клеточного состава позволяют говорить о высоком риске развития заболеваний печени, связанных с заменой нормальной паренхимы органа на соединительную ткань и ее терминальной стадии – цирроза. Поэтому лечение пожилых людей с хроническими заболеваниями печени является сложной задачей и требует индивидуально-го подхода, а также новых исследований, которые позволят выявить другие безопасные и эффективные методы лечения. В частности, наши данные подтверждают активацию экспрессии Sox9 в печени и позволяют предложить Sox9 в качестве биомаркера или антифиброзной мишени при разработке новых методов лечения хронических заболеваний печени у возрастных пациентов.

Заключение

В печени 12-месячных крыс по сравнению с 6-месячными увеличивается количество клеток, экспрессирующих Sox9, лимфоцитов с воспалительным фенотипом, снижается число ГСК, МСК и различных популяций эпителиальных и эндотелиальных клеток, что приводит к уменьшению регенераторной способности печени, нарушению тканевой архитектуры органа и липидного обмена. Эти изменения во многом определяют повышенную предрасположенность с возрастом к развитию хронических заболеваний печени.

Список литературы / References

1. Fraser H.C., Kuan V., Johnen R., Zwierzyna M., Hingorani A.D., Beyer A., Partridge L. Biological mechanisms of aging predict age-related disease co-occurrence in patients. *Aging Cell*. 2022;21(4):e13524. doi: 10.1111/accel.13524
2. Radonjić T., Dukić M., Jovanović I., Zdravković M., Mandić O., Popadić V., Popović M., Nikolić N., Klačnja S., Divac A., Todorović Z., Branković M. Aging of liver in its different diseases. *Int. J. Mol. Sci*. 2022;23(21):13085. doi: 10.3390/ijms232113085
3. Moon C.M., Kim S.K., Heo S.H., Shin S.S. Hemodynamic changes in the portal vein with age: evaluation using four-dimensional flow MRI. *Sci. Rep*. 2023;13(1):7397. doi: 10.1038/s41598-023-34522-z
4. Helmersson-Karlqvist J., Ridefelt P., Lind L., Larsson A. Reference values for 34 frequently used laboratory tests in 80-year-old men and women. *Maturitas*. 2016;92:97–101. doi: 10.1016/j.maturitas.2016.07.015
5. Lasry A., Ben-Neriah Y. Senescence-associated inflammatory responses: aging and cancer perspectives. *Trends Immunol*. 2015;36(4):217–228. doi: 10.1016/j.it.2015.02.009
6. Zhao Y., Yang Y., Li Q., Li J. Understanding the unique microenvironment in the aging liver. *Front. Med. (Lausanne)*. 2022;9:842024. doi: 10.3389/fmed.2022.842024
7. Antwi M.B., Dumitriu G., Simón-Santamaria J., Romano J.S., Li R., Smedsrød B., Vik A., Eskild W., Sørensen K.K. Liver sinusoidal endothelial cells show reduced scavenger function and downregulation of Fc gamma receptor IIb, yet maintain a preserved fenestration in the Glmpgt/gt mouse model of slowly progressing liver fibrosis. *PLoS One*. 2023;18(11):e0293526. doi: 10.1371/journal.pone.0293526
8. Wang W., Xu K., Shang M., Li X., Tong X., Liu Z., Zhou L., Zheng S. The biological mechanism and emerging therapeutic interventions of liver aging. *Int. J. Biol. Sci*. 2024;20(1):280–295. doi: 10.7150/ijbs.87679
9. Tanimizu N., Ichinohe N., Ishii M., Kino J., Mizuguchi T., Hirata K., Mitaka T. Liver progenitors isolated from adult healthy mouse liver efficiently differentiate to functional hepatocytes in vitro and repopulate liver tissue. *Stem Cells*. 2016;34(12):2889–2901. doi: 10.1002/stem.2457/
10. Yamazaki T., Enosawa S., Kasahara M., Fukuda A., Sakamoto S., Shigeta T., Nakazawa A., Tokiwa T. Isolation of hepatic progenitor cells from human liver with cirrhosis secondary to biliary atresia using EpCAM or Thy-1 markers. *Cell. Med*. 2012;15(1–3):121–126. doi: 10.3727/215517912X639441
11. Fernández A., Mazuecos L., Pintado C., Rubio B., López V., de Solís A.J., Rodríguez M., Andrés A., Gallardo N. Effects of moderate chronic food restriction on the development of postprandial dyslipidemia with ageing. *Nutrients*. 2019;11(8):1865. doi: 10.3390/nu11081865
12. Guillén J., Robinson S., Decelle T., Exner C., van Vliissingen M.F. Approaches to animal research project evaluation in Europe after implementation of Directive 2010/63/EU. *Lab. Anim. (NY)*. 2015;44(1):23–31. doi: 10.1038/labam.604
13. Lessa A.S., Paredes B.D., Dias J.V., Carvalho A.B., Quintanilha L.F., Takiya C.M., Tura B.R., Rezende G.F., Campos de Carvalho A.C., Resende C.M., Goldenberg R.C. Ultrasound imaging in an experimental model of fatty liver disease and cirrhosis in rats. *BMC Vet. Res*. 2010;6:6. doi: 10.1186/1746-6148-6-6
14. Cardiff R.D., Miller C.H., Munn R.J. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harb. Protoc*. 2014;2014(6):655–658. doi: 10.1101/pdb.prot073411
15. Pan E.S., Pakhomova A.V., Ermakova N.N., Afanas'ev S.A., Rebrova T.Y., Zhukova M.A., Sandrikina L.A., Putrova O.D., Kogai L.V., Pershina O.V., Dygai A.M., Skurikhin E.G. Age-related features of ketanserin effects in experimental liver cirrhosis. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2022;174(2):205–209. doi: 10.1007/s10517-023-05674-9
16. Gholami Bahnemiri M., Mirabedini S., Mohammadi P., Barmaki H., Qaffaripour Z., Rezapour M., Alijanpour M. Determination of serum alkaline phosphatase reference in healthy children aged 1-18 years. *Caspian J. Intern. Med*. 2022;13(4):749–756. doi: 10.22088/cjim.13.4.749
17. Maeso-Díaz R., Ortega-Ribera M., Lafoz E., Lozano J.J., Baiges A., Francés R., Albillos A., Peralta C., García-Pagán J.C., Bosch J., Cogger V.C., Gra-

- cia-Sancho J. Aging influences hepatic microvascular biology and liver fibrosis in advanced chronic liver disease. *Aging Dis.* 2019;10(4):684–698. doi: 10.14336/AD.2019.0127
18. Pinto C., Ninfole E., Benedetti A., Maroni L., Marziani M. Aging-related molecular pathways in chronic cholestatic conditions. *Front. Med. (Lausanne)*. 2020;6:332. doi: 10.3389/fmed.2019.00332
19. Skurikhin E.G., Afanas'ev S.A., Zhukova M.A., Rebroya T.Y., Muslimova E.F., Pan E.S., Ermakova N.N., Pershina O.V., Pakhomova A.V., Putrova O.D., ... Dygai A.M. Age-related features of the viscosity of plasma and mitochondrial membranes of hepatocytes in liver cirrhosis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2021;171(6):707–712. doi: 10.1007/s10517-021-05300-6
20. Asumda F.Z., Chase P.B. Age-related changes in rat bone-marrow mesenchymal stem cell plasticity. *BMC Cell Biology*. 2011;12:44. doi: 10.1186/1471-2121-12-44
21. Kaur S., Sehgal R., Shastr S.M., McCaughan G., McGuire H.M., Fazekas St. de Groth B., Sarin S., Trehanpati N., Seth D. Circulating endothelial progenitor cells present an inflammatory phenotype and function in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Front. Physiol.* 2018;9:556. doi: 10.3389/fphys.2018.00556
22. Lazarevic I., Soldati S., Mapunda J.A., Rudolph H., Rosito M., de Oliveira A.C., Enzmann G., Nishihara H., Ishikawa H., Tenenbaum T., Schrott H., Engelhardt B. The choroid plexus acts as an immune cell reservoir and brain entry site in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Fluids Barriers CNS*. 2023;20(1):39. doi: 10.1186/s12987-023-00441-4
23. Qian L., Zhang H., Gu Y., Li D., He S., Wang H., Cheng Y., Yang W., Yu H., Zhao X., ... Zhang Y. Reduced production of laminin by hepatic stellate cells contributes to impairment in oval cell response to liver injury in aged mice. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(12):3713–3735. doi: 10.18632/aging.101665
24. Athwal V.S., Pritchett J., Martin K., Llewellyn J., Scott J., Harvey E., Zaitoun A.M., Mullan A.F., Zeef L.A.H., Friedman S.L., ... Piper Hanley K. SOX9 regulated matrix proteins are increased in patients serum and correlate with severity of liver fibrosis. *Sci. Rep.* 2019;9(1):11547. doi: 10.1038/s41598-019-47715-2
25. Ming Z., Vining B., Bagheri-Fam S., Harley V. SOX9 in organogenesis: shared and unique transcriptional functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 2022;79(10):522. doi: 10.1007/s00018-022-04543-4
26. Marcos R., Lopes C., Malhão F., Correia-Gomes C., Fonseca S., Lima M., Gebhardt R., Rocha E. Stereological assessment of sexual dimorphism in the rat liver reveals differences in hepatocytes and Kupffer cells but not hepatic stellate cells. *J. Anat.* 2016;228(6):996–1005. doi: 10.1111/joa.12448
27. DeLeve L.D. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis. *Hepatology*. 2015;61(5):1740–1746. doi: 10.1002/hep.27376
28. Maeso-Díaz R., Ortega-Ribera M., Fernández-Iglesias A., Hide D., Muñoz L., Hessheimer A.J., Vila S., Francés R., Fondevila C., Albillos A., ... Gracia-Sancho J. Effects of aging on liver microcirculatory function and sinusoidal phenotype. *Aging Cell*. 2018;17(6):e12829. doi: 10.1111/acel.12829

Сведения об авторах:

Першина Ольга Викторовна, д.м.н., ORCID: 0000-0002-0468-0272, e-mail: ovpershina@gmail.com
Узянбаев Ильдар Ахметович, ORCID: 0000-0003-1878-4993, e-mail: wertyg233@gmail.com
Пахомова Ангелина Владимировна, д.м.н., ORCID: 0000-0003-0725-1323, e-mail: angelinapakhomova2011@gmail.com
Пан Эдгар Сергеевич, к.б.н., ORCID: 0000-0002-2163-7647, e-mail: artifexpan@gmail.com
Когай Лена Владимировна, к.м.н., ORCID: 0009-0004-3332-6194, e-mail: kogay-lena@mail.ru
Ермакова Наталия Николаевна, д.м.н., ORCID: 0000-0002-6268-2938, e-mail: nejela@mail.ru
Сандрикина Любовь Александровна, к.м.н., ORCID: 0000-0001-5775-0353, e-mail: ermolaeva_la@mail.ru
Курбатов Борис Константинович, ORCID: 0000-0001-9603-822X, e-mail: bobersanker@gmail.com
Крупин Вячеслав Андреевич, д.м.н., ORCID: 0000-0001-8263-7184, e-mail: vakrupin88@gmail.com

Information about the authors:

Olga V. Pershina, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-0468-0272, e-mail: ovpershina@gmail.com
Ildar A. Uzyanbaev, ORCID: 0000-0003-1878-4993, e-mail: wertyg233@gmail.com
Angelina V. Pakhomova, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0003-0725-1323, e-mail: angelinapakhomova2011@gmail.com
Edgar S. Pan, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-2163-7647, e-mail: artifexpan@gmail.com
Lena V. Kogay, candidate of medical sciences, ORCID: 0009-0004-3332-6194, e-mail: kogay-lena@mail.ru
Natalia N. Ermakova, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-6268-2938, e-mail: nejela@mail.ru
Lyubov A. Sandrikina, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0001-5775-0353, e-mail: ermolaeva_la@mail.ru
Boris K. Kurbatov, ORCID: 0000-0001-9603-822X, e-mail: bobersanker@gmail.com
Vyacheslav A. Krupin, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0001-8263-7184, e-mail: vakrupin88@gmail.com

Поступила в редакцию 15.03.2024

После доработки 07.06.2024

После повторной доработки 02.08.2024

Принята к публикации 02.08.2024

Received 15.03.2024

Revision received 07.06.2024

Second revision received 02.08.2024

Accepted 02.08.2024