

**М.Б. Дибя<sup>1</sup>, Т.Д. Задорожна<sup>1</sup>, В.С. Березенко<sup>1,2</sup>**

## Особливості біліарної і гепатоцелюлярної сенесценції при аутоімунному та первинному склерозуючому холангіті в дітей

<sup>1</sup>ДУ «Всеукраїнський центр материнства та дитинства НАМН України», м. Київ

<sup>2</sup>Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

Modern Pediatrics. Ukraine. (2025). 5(149): 20-26; doi 10.15574/SP.2025.5(149).2026

**For citation:** Dyba MB, Zadorozhna TD, Berezenko VS. (2025). Features of hepatocellular and biliary senescence in pediatric autoimmune and primary sclerosing cholangitis. Modern Pediatrics. Ukraine. 5(149): 20-26. doi: 10.15574/SP.2025.5(149).2026.

Клітинну сенесценцію розглядають як один із ключових механізмів прогресування фіброзу при імунних холангіопатіях. Маркери p16<sup>INK4a</sup> і p21<sup>WAF1/Cip1</sup> відображають сенесцентний фенотип, проте немає даних щодо їхньої експресії в дітей з аутоімунним склерозуючим холангітом (АСХ) і первинним склерозуючим холангітом (ПСХ).

**Мета** – оцінити експресію p16<sup>INK4a</sup> і p21<sup>WAF1/Cip1</sup> у печінкових біоптатах дітей з АСХ і ПСХ; визначити їхнє патогенетичне і діагностичне значення.

**Матеріали і методи.** Проаналізовано 27 біоптатів печінки дітей віком 4-18 років (18 – з АСХ, 9 – із ПСХ). Морфологічні зміни і стадію фіброзу оцінено за класифікацією Nakanuma. Для виявлення сенесценції застосовано імуногістохімічне фарбування на p16<sup>INK4a</sup> і p21<sup>WAF1/Cip1</sup> у холангіоцитах і гепатоцитах.

**Результати.** Експресію p16<sup>INK4a</sup> у холангіоцитах визначали із високою частотою як при АСХ (77,8%), так і при ПСХ (88,9%). Сенесцентні холангіоцити з експресією p16<sup>INK4a</sup> виявляли вже на ранніх стадіях захворювання, що підтверджує раннє формування біліарного фенотипу сенесценції. Експресія p21<sup>WAF1/Cip1</sup> у холангіоцитах була рідкісною (16,7% і 11,1%, відповідно). У гепатоцитах при АСХ експресію p16<sup>INK4a</sup> (83,3% проти 22,2%) і p21<sup>WAF1/Cip1</sup> (66,7% проти 11,1%) виявляли значно частіше, ніж при ПСХ.

**Висновки.** У більшості дітей з АСХ і ПСХ виявлено p16<sup>INK4a</sup>-позитивні холангіоцити, що підтверджує біліарний фенотип сенесценції як ключову патогенетичну ознаку цих захворювань. Для АСХ характерне додаткове поєднання гепатоцелюлярного і біліарного фенотипів сенесценції, яке може сприяти швидшому прогресуванню фіброзу. Експресію p16<sup>INK4a</sup> і p21<sup>WAF1/Cip1</sup> у гепатоцитах і холангіоцитах можна розглядати як потенційний морфологічний предиктор тяжкого перебігу АСХ і ПСХ, а також перспективну мішень для нових терапевтичних стратегій.

Дослідження виконано відповідно до принципів Гельсінської декларації та схвалено етичним комітетом установи. На проведення дослідження отримано інформовану згоду пацієнтів.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Ключові слова:** аутоімунні захворювання печінки, діти, первинний склерозуючий холангіт, аутоімунний склерозуючий холангіт, гепатоцелюлярна сенесценція, біліарна сенесценція, холангіоцити, p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>WAF1/Cip1</sup>.

## Features of hepatocellular and biliary senescence in pediatric autoimmune and primary sclerosing cholangitis

**M.B. Dyba<sup>1</sup>, V.S., T.D. Zadorozhna<sup>1</sup>, Berezenko<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>SI «Ukrainian Center for maternity and childhood of NAMS of Ukraine», Kyiv

<sup>2</sup>Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Cellular senescence is considered one of the key mechanisms driving fibrosis progression in immune-mediated cholangiopathies. The markers p16<sup>INK4a</sup> and p21<sup>WAF1/Cip1</sup> reflect the senescent phenotype; however, data on their expression in children with autoimmune sclerosing cholangitis (ASC) and primary sclerosing cholangitis (PSC) are lacking.

**Aim** – to evaluate the expression of p16<sup>INK4a</sup> and p21<sup>WAF1/Cip1</sup> in liver biopsies of children with ASC and PSC and to determine their pathogenetic and diagnostic significance.

**Materials and methods.** Twenty-seven liver biopsies from children aged 4-18 years (18 with ASC, 9 with PSC) were analyzed. Morphological changes and fibrosis stage were assessed according to the Nakanuma classification. Immunohistochemistry for p16<sup>INK4a</sup> and p21<sup>WAF1/Cip1</sup> was performed in cholangiocytes and hepatocytes to detect cellular senescence.

**Results.** p16<sup>INK4a</sup> expression in cholangiocytes was frequent in both ASC (77.8%) and PSC (88.9%). Senescent cholangiocytes with p16<sup>INK4a</sup> expression were already present at early disease stages, confirming the early development of the biliary senescence phenotype. p21<sup>WAF1/Cip1</sup> expression in cholangiocytes was rare (16.7% and 11.1%, respectively). In hepatocytes, expression of p16<sup>INK4a</sup> (83.3% vs 22.2%) and p21<sup>WAF1/Cip1</sup> (66.7% vs 11.1%) was significantly more frequent in ASC than in PSC.

**Conclusions.** In most children with ASC and PSC, p16<sup>INK4a</sup>-positive cholangiocytes were detected, confirming the biliary senescence phenotype as a key pathogenetic feature. ASC was additionally characterized by the coexistence of hepatocellular and biliary senescence phenotypes, which may contribute to faster fibrosis progression. Expression of p16<sup>INK4a</sup> and p21<sup>WAF1/Cip1</sup> in hepatocytes and cholangiocytes may serve as a potential morphological biomarker of severe disease course and as a promising target for novel therapeutic strategies.

The study complied with the principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the institutional ethics committee. Informed consent was obtained from the patients prior to participation.

The authors declare no conflict of interest.

**Keywords:** pediatric autoimmune liver disease; primary sclerosing cholangitis; autoimmune sclerosing cholangitis; hepatocellular senescence; biliary senescence; cholangiocytes; p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>WAF1/Cip1</sup>.

## Вступ

**П**ервинний склерозуючий холангіт (ПСХ) є рідкісним, хронічним, прогресуючим холестатичним захворюванням печінки невідомої етіології, яке належить до групи імунних холангіопатій [24]. Його патогенетичною основою є формування фіброзу навколо внутрішньо- і/або позапечінкових жовчних протоків, що призводить до їхнього звуження, розширення або облітерації, з подальшим розвитком фіброзу і біліарного цирозу печінки. ПСХ має тісний зв'язок із запальними захворюваннями кишечника [25] і високим ризиком розвитку гепатобіліарних злоякісних новоутворень, серед яких найчастіше трапляються холангіокарцинома, карцинома жовчного міхура і колоректальний рак [7]. У дітей ПСХ може мати два фенотипи: класичний варіант без ознак аутоімунного гепатиту (АІГ) і варіант із поєднаним АІГ, відомий як аутоімунний склерозуючий холангіт (АСХ) [2,17,20]. ПСХ розглядають як мультифакторне захворювання, у формуванні якого беруть участь генетична схильність, чинники довкілля, активація вродженого імунітету кишковими мікробними продуктами та порушення адаптивних імунних відповідей. Вважають, що ключову роль у запуску і підтриманні біліарного ушкодження відіграють саме холангіоцити. У відповідь на ендогенні або екзогенні пошкодження холангіоцити набувають здатності до проліферації та секреції низки прозапальних медіаторів, які діють у паракринний і/або аутокринний спосіб. Це призводить до рекрутування та активації імунних клітин і фібробластів, що, своєю чергою, індукує формування типових для ПСХ фіброзно-запальних ушкоджень жовчних ходів [11,18]. За тривалого хронічного ушкодження репаративний процес стає неефективним, запальна відповідь зберігається, що індукує клітинне старіння (сенесценцію) у хронічно ушкоджених холангіоцитах [5,10,16], яке супроводжується стійкою зупинкою клітинного циклу, морфофункціональною перебудовою холангіоцитів і зміною мікрооточення порталних трактів. Клітинна сенесценція – це стан клітини, який виникає у відповідь на стресові стимули або певні фізіологічні процеси і характеризується тривалою, зазвичай непоправною зупинкою клітинного циклу у фазі G1. Вона супроводжується набуттям клітиною специфічних секреторних властивостей (так званий секреторний фенотип, асоційований зі старінням, –

SASP), макромолекулярними ушкодженнями і змінами метаболізму. Сенесценція може бути індукована різними чинниками, зокрема, надмірною мітогенною або онкогенною стимуляцією, укороченням теломер і/або позателомерними пошкодженнями ДНК, і виконує захисну функцію, запобігаючи неконтрольованій проліферації ушкоджених клітин [9]. Особливу роль у регулюванні клітинного циклу відіграють інгібітори циклічнозалежних кіназ p16<sup>INK4a</sup> і p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, які розглядаються як маркери сенесценції [4,5]. Виявлення цих білків у холангіоцитах може свідчити про активацію процесів сенесценції, що потенційно пов'язано з прогресуванням фіброзу [14]. За даними дослідників, сенесценція може бути причиною дуктопенії, яку вважають однією з ключових діагностичних ознак імунних холангіопатій (біліарна атрезія, первинний біліарний холангіт, ПСХ) [22].

На сьогодні не існує ефективної фармакотерапії, здатної сповільнити прогресування ПСХ. Єдиним методом, що продовжує життя пацієнтів, залишається трансплантація печінки. Важливо, що клітинна сенесценція може бути мішенню для терапії за допомогою сенолітиків. Останні експериментальні роботи вказують, що елімінування сенесцентних клітин за допомогою сенолітиків (наприклад, комбінація дазатинібу і кверцетину) або модифікація їхньої активності за допомогою клітинної терапії із застосуванням алогенних прогеніторних клітин печінки (human allogenic liver-derived progenitor cells, HALPC) може зменшувати прогресування фіброзу. Хоча ці підходи наразі досліджуються лише в дорослих пацієнтів або в доклінічних моделях, вони підкреслюють важливість оцінювання сенесценції в дітей із ПСХ, оскільки це може відкрити перспективи нових терапевтичних стратегій у майбутньому [6,14,15]. У доступній літературі немає даних щодо експресії p16<sup>INK4a</sup> і p21<sup>WAF1/CIP1</sup> у дітей з АСХ і ПСХ, що підкреслює актуальність і новизну проведеного дослідження.

**Мета** дослідження – оцінити експресію p16<sup>INK4a</sup> і p21<sup>WAF1/CIP1</sup> у біоптатах печінки дітей з АСХ і ПСХ.

## Матеріали і методи дослідження

Біопсійний матеріал отримано з архіву лабораторії патоморфології ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України» та оцінено двома незалежними патоморфологами методом

Таблиця 1

Клініко-лабораторна характеристика дітей із первинним склерозуючим холангітом та автоімунним склерозуючим холангітом

| Показник                                       | АСХ (n=18)     | ПСХ (n=9)       | p      |
|------------------------------------------------|----------------|-----------------|--------|
| Дівчата, абс. (%)                              | 9 (50,0)       | 3 (33,3)        | 0,7**  |
| Вік, роки $\pm$ SD:                            | 11,4 $\pm$ 3,6 | 12,4 $\pm$ 3,24 | 0,5*   |
| 4–6 років, абс. (%)                            | 1 (5,6)        | -               | 1,0**  |
| 7–12 років, абс. (%)                           | 9 (50,0)       | 3 (33,3)        | 0,7**  |
| 13–17 років, абс. (%)                          | 8 (44,4)       | 6 (66,7)        | 0,4**  |
| 1-ша стадія фіброзу за Nakanuma, абс. (%)      | 3 (16,7)       | 5 (55,6)        | 0,07** |
| 2–3-тя стадія фіброзу за Nakanuma, абс. (%)    | 15 (83,3)      | 4 (44,4)        | 0,07** |
| Цироз печінки, абс. (%)                        | 6 (33,3)       | 2 (22,2)        | 0,7**  |
| Портальна гіпертензія, абс. (%)                | 2 (11,1)       | -               | 0,5**  |
| ПСХ великої протоки, абс. (%)                  | 11 (61,1)      | 6 (66,7)        | 1,0 ** |
| ПСХ з ураженням тільки малої протоки, абс. (%) | 7 (38,9)       | 3 (33,3)        | 1,0 ** |
| Запальні захворювання кишечника, абс. (%)      | 14 (77,8)      | 6 (66,7)        | 0,6 ** |

Примітки: \* – t-тест Стюдента; \*\* – точний критерій Фішера.

сліпого перегляду. Загалом зібрано 27 зразків тканини печінки (усі – голкові біопсії, які проведено в період 2018–2024 рр.). До зразків печінки увійшли 18 випадків АСХ і 9 випадків ПСХ. У всіх цих зразках було доступно понад 10 портальних трактів. Усі випадки АСХ і ПСХ відповідали клінічним, серологічним і гістологічним критеріям встановлення діагнозу [17].

Біоптати оброблено за стандартними методами: парафінові блоки, забарвлення гематоксилін-еозином, пікрофуксином за Ван-Гізоном і трихромом Массона. Стадію фіброзу печінки та активність гепатиту визначено за класифікацією Nakanuma [12].

Для оцінювання жовчних протоків, дуктулярного епітелію, дуктулярної реакції та біліарної метаплазії застосовано імуногістохімічне забарвлення СК7. Біліарні ураження визначено за модифікованою класифікацією Nakanuma з напівкількісною бальною оцінкою [12]. Для оцінювання клітинної сенесценції використано маркери p16<sup>INK4a</sup> і p21<sup>WAF1/Cip1</sup> [1]. Імуногістохімічне дослідження виконано на парафінових зрізах із застосуванням антитіла до p16 (клон EP16, мишаче моноклональне, Bio SB, Livermore, CA, USA) та антитіла до p21 (клон WA-1, мишаче моноклональне, Bio SB, Rockford, IL, USA; розведення 1:1000). Експресію p16<sup>INK4a</sup> оцінено за наявністю ядерного або ядерно-цитоплазматичного забарвлення, позитивність визначено лише за наявності ядерного компонента. Для p21<sup>WAF1/Cip1</sup> враховано виключно ядерне забарвлення, що вважається специфічним для цього маркера. Аналіз проведено окремо в дуктулах

і гепатоцитах. Для дрібних жовчних протоків застосовано напівкількісну систему: 0 балів – відсутність забарвлення; 1 бал – поодинокі слабо-позитивні клітини в  $\leq 1$  дрібному протоці; 2 бали – помірна або інтенсивна позитивність у  $\geq 2$  дрібних протоках. Подальшу інтерпретацію проведено у двох категоріях: негативна експресія (0–1 бал) і позитивна експресія 2 бали).

Статистичний аналіз. Нормальність розподілу даних перевірено за допомогою критерію Колмогорова–Смірнова. Безперервні змінні описано як середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення (SD). Для порівняння кількісних даних між двома групами застосовано Укритерій Манна–Вітні або двобічний t-тест Стюдента. Категоріальні змінні порівняно за допомогою точного тесту Фішера. Статистичні методи дослідження проведено з використанням програми «GraphPad Prism 10» (GraphPad Software Inc., США, GraphPad Prism 10.4.1.627, серійний номер GPS-2722055-T). Результати прийнято статистично значущими за  $p < 0,05$  [21].

Дослідження виконано відповідно до принципів Гельсінської декларації та затверджено локальним етичним комітетом (протокол № 6 від 21.12.2023) ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України». У 2024 р. заклад перейменовано на ДУ «Всеукраїнський центр материнства та дитинства НАМН України».

## Результати дослідження та їх обговорення

До дослідження увійшли біоптати печінки 27 дітей (18 дітей з АСХ і 9 дітей із ПСХ) віком

Таблиця 2

**Гістологічна характеристика ураження біліарного тракту в дітей з аутоімунними захворюваннями печінки (за класифікацією Nakamura)**

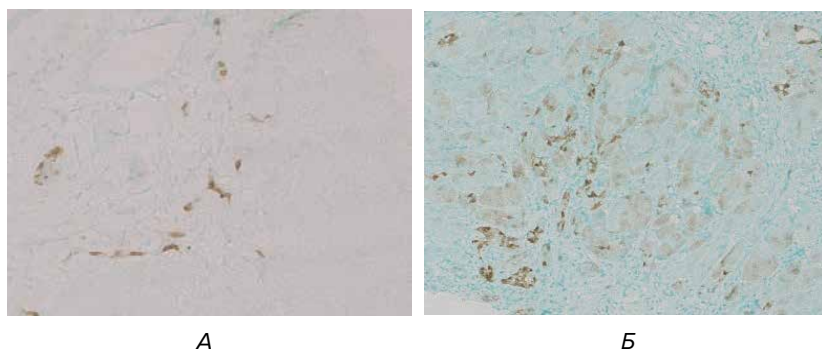
| Показник                                                       | АСХ (n=18) | ПСХ (n=9) | p       |
|----------------------------------------------------------------|------------|-----------|---------|
| Активність гепатиту, середній бал±SD                           | 2,4±0,7    | 1,9±0,6   | 0,07*   |
| Активність холангіту:                                          |            |           | 0,9**   |
| 0-го ступеня, абс. (%)                                         | 0          | 0         |         |
| 1-го ступеня, абс. (%)                                         | 7 (38,9)   | 3 (33,3)  |         |
| 2-го ступеня, абс. (%)                                         | 5 (27,8)   | 3 (33,3)  |         |
| 3-го ступеня, абс. (%)                                         | 6 (33,3)   | 3 (33,3)  |         |
| Активність холангіту, середній бал ±SD                         | 1,9±0,9    | 2,0±0,9   | 0,6*    |
| Дуктопенія:                                                    |            |           | 0,35**  |
| 0 ступеня, абс. (%)                                            | 3 (16,7)   | 0         |         |
| 1-го ступеня, абс. (%)                                         | 8 (44,4)   | 6 (66,7)  |         |
| 2-го ступеня, абс. (%)                                         | 7 (38,9)   | 3 (33,3)  |         |
| 3-го ступеня, абс. (%)                                         | 0          | 0         |         |
| Дуктопенія, середній бал±SD                                    | 1,2±0,7    | 1,3±0,5   | 0,8*    |
| Перидуктальний фіброз:                                         |            |           | 0,7**   |
| 0-го ступеня, абс. (%)                                         | 0          | 0         |         |
| 1-го ступеня, абс. (%)                                         | 0          | 0         |         |
| 2-го ступеня, абс. (%)                                         | 9 (50,0)   | 3 (33,3)  |         |
| 3-го ступеня, абс. (%)                                         | 9 (50,0)   | 6 (66,7)  |         |
| Перидуктальний фіброз, середній бал±SD                         | 2,5±0,5    | 2,7±0,5   | 0,4*    |
| Концентричний перидуктальний фіброз типу «onion-skin, абс. (%) | 12 (66,7)  | 8 (88,9)  | 0,4*    |
| Фіброзно-облітеруючий рубець, абс. (%)                         | 10 (55,6)  | 8 (88,9)  | 0,2*    |
| Дуктулярна реакція:                                            |            |           | 0,6**   |
| 1-го ступеня, абс. (%)                                         | 4 (22,2)   | 2 (22,2)  |         |
| 2-го ступеня, абс. (%)                                         | 6 (33,3)   | 5 (55,6)  |         |
| 3-го ступеня, абс. (%)                                         | 6 (33,3)   | 2 (22,2)  |         |
| 4-го ступеня, абс. (%)                                         | 2 (11,1)   | 0         |         |
| Дуктулярна реакція, середній бал (±SD)                         | 2,3±1,0    | 2,0±0,7   | 0,4*    |
| Біліарна метаплазія:                                           |            |           | 0,6**   |
| 0-го ступеня, абс. (%)                                         | 0 (38,9)   | 2 (22,2)  |         |
| 1-го ступеня, абс. (%)                                         | 6 (33,3)   | 3 (33,3)  |         |
| 2-го ступеня, абс. (%)                                         | 3 (16,7)   | 4 (28,6)  |         |
| 3-го ступеня, абс. (%)                                         | 2 (11,1)   | 0         |         |
| Біліарна метаплазія, середній бал ±SD                          | 1,0±1,0    | 1,2±0,8   | 0,6*    |
| Стадія фіброзу за Nakamura:                                    |            |           |         |
| 1-ша стадія, абс. (%)                                          | 3 (16,7)   | 5 (55,6)  |         |
| 2-га стадія, абс. (%)                                          | 9 (50,0)   | 2 (22,2)  |         |
| 3-тя стадія, абс. (%)                                          | 6 (33,3)   | 2 (22,2)  |         |
| Стадія фіброзу за Nakamura, середній бал ±SD                   | 2,2±0,8    | 1,7±0,9   | 0,15*   |
| Експресія p16 <sup>INK4a</sup> в дуктулах, абс. (%)            | 14 (77,8)  | 8 (88,9)  | 0,6**   |
| Експресія p16 <sup>INK4a</sup> в гепатоцитах, абс. (%)         | 15 (83,3)  | 2 (22,2)  | 0,004** |
| Експресія p21 <sup>WAF1/Cip1</sup> в дуктулах, абс. (%)        | 3 (16,7)   | 1 (11,1)  | 1,0**   |
| Експресія p21 <sup>WAF1/Cip1</sup> в гепатоцитах, абс. (%)     | 12 (66,7)  | 1 (11,1)  | 0,013** |

Примітки: \* – Укритерій за Манна-Вітні; \*\* – точний критерій Фішера.

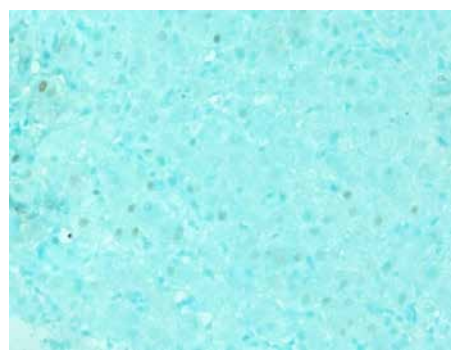
від 4 до 18 років, які проходили обстеження у відділенні гепатології. Клініко-лабораторну характеристику дітей наведено в таблиці 1.

Групи АСХ і ПСХ за основними клінічними й морфологічними характеристиками не мали ста-

тистичної відмінності. У пацієнтів з АСХ частка дітей із просунутим фіброзом – F 2-3 (15 (83,3%) осіб) – була вищою порівняно з ПСХ – 4 (44,4%) пацієнти, однак різниця не досягла статистичної значущості (p=0,07). Цироз печінки відзначали



**Рис. 1.** Імуногістохімічна експресія p16<sup>INK4a</sup> в цитоплазмі та ядрі перипортальних дуктулярних клітин та в дуктулах портального тракту: А – у хлопчика віком 9 років із ПСХ, стадія фіброзу 2 за Nakanuma, збільшення  $\times 200$ ; Б – у дівчинки віком 17 років з АСХ, стадія фіброзу 3 за Nakanuma, збільшення  $\times 200$



**Рис. 2.** Імуногістохімічна експресія p21<sup>WAF1/Cip1</sup> в ядрах гепатоцитів у хлопчика 12 років з АСХ. Стадія фіброзу 3 за Nakanuma. Збільшення  $\times 200$

в 6 (33,3%) дітей із АСХ та у 2 (22,2%) – із ПСХ ( $p=0,7$ ). Частота фенотипів ПСХ за ураженням протоків також не відрізнялася між групами: фенотип з ураженням великих протоків мали 11 (61,1%) дітей з АСХ і 6 (66,7%) дітей із ПСХ ( $p=1,0$ ), а ізольоване ураження дрібних протоків – у 7 (38,9%) і 3 (33,3%), відповідно ( $p=1,0$ ). Частота супутніх запальних захворювань кишечника була високою в обох групах (14 (77,8%) і 6 (66,7%) пацієнтів, відповідно;  $p=0,6$ ).

Гістологічну характеристику ураження біліарного тракту (за класифікацією Nakanuma) наведено в таблиці 2.

За результатами порівняння морфологічних й імуногістохімічних показників між групами дітей з АСХ і ПСХ не виявлено статистично значущих відмінностей за більшістю показників, що підтверджує їхній спільний патогенез. Активність гепатиту мала тенденцію до вищих значень у групі АСХ ( $2,4 \pm 0,7$  проти  $1,9 \pm 0,6$ ;  $p=0,07$ ). Активність холангіту, вираженість дуктопенії, перидуктального фіброзу, дуктулярної реакції та біліарної метаплазії були подібними у двох групах як за розподілом ступенів, так і за середнім балом. Стадії фіброзу за Nakanuma також не відрізнялися ( $2,2 \pm 0,8$  при АСХ проти  $1,7 \pm 0,9$  при ПСХ;  $p=0,15$ ).

У дуктулах експресію p16<sup>INK4a</sup> виявляли з високою частотою як при АСХ, так і при ПСХ (14 (77,8%) і 8 (88,9%) пацієнтів, відповідно;  $p=0,64$ ) (рис. 1). На відміну від цього, p21<sup>WAF1/Cip1</sup> у дуктулах визначали рідко (3 (16,7%) і 1 (11,1%) пацієнт, відповідно;  $p=1,0$ ). У гепатоцитах при АСХ спостерігали високу частоту позитивності як для p16<sup>INK4a</sup> (15 (83,3%) осіб), так і для p21<sup>WAF1/Cip1</sup> (12 (66,7%) осіб) (рис. 2). Для ПСХ відповідні показники були значно ниж-

чими – 2 (22,2%) пацієнти для p16 ( $p=0,004$ ) і 1 (11,1%) пацієнт для p21 ( $p=0,013$ ).

Клітинна сенесценція визначається як стійка зупинка клітинного циклу у відповідь на різні стресові стимули. Такі клітини залишаються метаболічно активними, але втрачають здатність до проліферації та впливають на мікрооточення завдяки секреції прозапальних цитокінів і чинників росту (сенесценція-асоційований секреторний фенотип, SASP). Сенесценція має подвійне значення: з одного боку, вона запобігає проліферації пошкоджених клітин і виконує протипухлинну функцію, а з іншого – призводить до виснаження регенераторних резервів і прогресування фіброзу. У печінці сенесценція описана як у гепатоцитах, так і в холангіоцитах і зірчастих клітинах, що визначає її роль у різних хронічних хворобах, у т.ч. ПСХ [19].

В експериментальних моделях показано, що активація p53 у холангіоцитах індукує p21 та p16 і запускає паракринну, TGF $\beta$ -залежну сенесценцію сусідніх клітин, що призводить до поширення патологічного процесу на сусідні клітини [13]. Сенесценція гепатоцитів добре задокументована при різних хворобах печінки, у т.ч. при первинному біліарному холангіті та ПСХ. Крім того, описано явище сенесценції зірчастих клітин печінки при фіброзі [23,26]. За нашими даними, більшість пацієнтів з АСХ (78%) і ПСХ (89%) мають позитивний p16<sup>INK4a</sup> на холангіоцитах як у портальних, так і в перипортальних зонах, що відображає сенесцентний фенотип біліарного епітелію в наших пацієнтів. У нашому дослідженні експресію p21<sup>WAF1/Cip1</sup> в ядрах холангіоцитів відзначали рідко як при АСХ (16,7%), так і при ПСХ (11,1%), на відміну від високої частоти p16<sup>INK4a</sup>-позитивності. Це може свідчити, що

біліарна сенесценція в дітей не є наслідком гострого пошкодження ДНК, а формується як TGF $\beta$ -залежний фенотип. Така відмінність між експресією p16<sup>INK4a</sup> і p21<sup>WAF1/Cip1</sup> у холангіоцитах свідчить, що ураження жовчних протоків при АСХ і ПСХ має хронічний, поступово прогресуючий характер, у якому ключову роль відіграють сигнали мікрооточення, а не гостра стрес-індукована відповідь.

На відміну від ПСХ, у дітей з АСХ спостерігали високу частоту експресії p21<sup>WAF1/Cip1</sup> і p16<sup>INK4a</sup> в ядрах гепатоцитів, що свідчить про поєднання двох сенесцентних фенотипів у дітей з АСХ: гепатоцелюлярного і біліарного. Гепатоцелюлярний фенотип сенесценції характеризується експресією p21<sup>WAF1/Cip1</sup> і p16<sup>INK4a</sup> у гепатоцитах, що можна пов'язати з активацією p53 за інтенсивного запалення та ушкодження ДНК, з дією TGF $\beta$ , а також із повторними циклами пошкодження й регенерації. Це призводить до обмеження регенераторного потенціалу паренхіми й стимуляції SASP-опосередкованого фіброгенезу [8]. Паракринний механізм CCL2-TGF $\beta$ , описаний T.G. Bird та співавт., підтверджує, що навіть обмежена популяція сенесцентних гепатоцитів здатна індукувати сенесценцію в навколишніх клітинах і стимулювати фіброгенез. Це може пояснювати

швидше формування фіброзу і цирозу при АСХ порівняно з ПСХ [3].

З клінічної точки зору, позитивну експресію p21<sup>WAF1/Cip1</sup> і p16<sup>INK4a</sup> в холангіоцитах і гепатоцитах можна розглядати як потенційні морфологічні біомаркери тяжкого перебігу АСХ і ПСХ, а також як мішені для майбутніх терапевтичних стратегій.

## Висновки

Встановлено, що в більшості пацієнтів з АСХ (78%) і ПСХ (89%) виявляються p16<sup>INK4a</sup>-позитивні холангіоцити в портальних і перипортальних зонах, що свідчить про формування сенесцентного фенотипу біліарного епітелію вже на ранніх стадіях захворювання.

У дітей з АСХ виявлено поєднання гепатоцелюлярного і біліарного фенотипів сенесценції, що обумовлює швидше прогресування фіброзу і цирозу порівняно з ПСХ.

Імуногістохімічна експресія p16<sup>INK4a</sup> і p21<sup>WAF1/Cip1</sup> у ядрах гепатоцитів і епітелії холангіол, виявлена у хворих на АСХ і ПСХ, може розглядатися як потенційний морфологічний предиктор тяжкого перебігу та як перспективна мішень для нових терапевтичних стратегій.

*Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.*

## REFERENCES/ЛІТЕРАТУРА

1. Bateman AC, Hübscher SG. (2010). Cytokeratin expression as an aid to diagnosis in medical liver biopsies. *Histopathology*. 56(4): 415-425. doi: 10.1111/j.1365-2559.2009.03391.x.
2. Beretta-Piccoli BT, Vergani D, Mieli-Vergani G. (2018). Autoimmune sclerosing cholangitis: Evidence and open questions. *J Autoimmun*. 95: 15-25. doi: 10.1016/j.jaut.2018.10.008.
3. Bird TG, Müller M, Boulter L et al. (2018). TGF $\beta$  inhibition restores a regenerative response in acute liver injury by suppressing paracrine senescence. *Sci Transl Med*. 10(454). doi: 10.1126/scitranslmed.aan1230.
4. Blokland KEC, Pouwels SD, Schuliga M, Knight DA, Burgess JK. (2020). Regulation of cellular senescence by extracellular matrix during chronic fibrotic diseases. *Clin Sci (Lond, Engl : 1979)*. 134(20): 2681-2706. doi: 10.1042/cs20190893.
5. Cazzagon N, Sarcognato S, Floreani A et al. (2021). Cholangiocyte senescence in primary sclerosing cholangitis is associated with disease severity and prognosis. *JHEP Rep*. 3(3): 100286. doi: 10.1016/j.jhepr.2021.100286.
6. Clinical Trials.gov. Dasatinib and Quercetin to Treat Fibrotic Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Identifier: NCT05506488. URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05506488>.
7. Deneau MR, Mack C, Perito ER et al. (2021). The Sclerosing Cholangitis Outcomes in Pediatrics (SCOPE) Index: A Prognostic Tool for Children. *Hepatology*. 73(3): 1074-1087. doi: 10.1002/hep.31393.
8. Ferreira-Gonzalez S, Lu WY, Raven A et al. (2018). Paracrine cellular senescence exacerbates biliary injury and impairs regeneration. *Nat Commun*. 9(1): 1020. doi: 10.1038/s41467-018-03299-5.
9. González-Gualda E, Baker AG, Fruk L, Muñoz-Espín D. (2021). A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *FEBS J*. 288(1): 56-80. doi: 10.1111/febs.15570.
10. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A et al. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*. 179(4): 813-827. doi: 10.1016/j.cell.2019.10.005.
11. Guicciardi ME, Trussone CE, LaRusso NF, Gores GJ. (2020). The Spectrum of Reactive Cholangiocytes in Primary Sclerosing Cholangitis. *Hepatology*. 71(2): 741-748. doi: 10.1002/hep.31067.
12. Harada K, Hsu M, Ikeda H, Zeniya M, Nakanuma Y. (2013). Application and Validation of a New Histologic Staging and Grading System for Primary Biliary Cirrhosis. *J Clin Gastroenterol*. 47(2): 174-181. doi: 10.1097/mcg.0b013e31827234e4.
13. He S, Sharpless NE. (2017). Senescence in Health and Disease. *Cell*. 169(6): 1000-1011. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.015.
14. Jannone G, Riani EB, de Magnée C et al. (2023). Senescence and senotherapies in biliary atresia and biliary cirrhosis. *Aging (Albany NY)*. 15(11): 4576-4599. doi: 10.18632/aging.204700.
15. Kyritsi K, Francis H, Zhou T et al. (2020). Downregulation of p16 Decreases Biliary Damage and Liver Fibrosis in the Mdr2 / Mouse Model of Primary Sclerosing Cholangitis. *Gene Expr*. 20(2): 89-103. doi: 10.3727/105221620x15889714507961.
16. Meadows V, Baiocchi L, Kundu D et al. (2021). Biliary Epithelial Senescence in Liver Disease: There Will Be SASP. *Front Mol Biosci*. 8: 803098. doi: 10.3389/fmolb.2021.803098.
17. Mieli-Vergani G, Vergani D, Baumann U et al. (2018). Diagnosis and Management of Pediatric Autoimmune Liver Disease. *J Pe-*

- diatr Gastroenterol Nutr. 66(2): 345-360. doi: 10.1097/mpg.0000000000001801.
18. Nakanuma Y, Sasaki M, Harada K. (2015). Autophagy and senescence in fibrosing cholangiopathies. *J Hepatol.* 62(4): 934-945. doi: 10.1016/j.jhep.2014.11.027.
  19. Rastogi A, Nigam N, Gayatri R, Bihari C, Pamecha V. (2022). Biliary Epithelial Senescence in Cellular Rejection Following Live Donor Liver Transplantation. *J Clin Exp Hepatol.* 12(6): 1420-1427. doi: 10.1016/j.jceh.2022.08.004.
  20. Ricciuto A, Kamath BM, Hirschfield GM, Trivedi PJ. (2023). Primary sclerosing cholangitis and overlap features of autoimmune hepatitis: A coming of age or an age-ist problem? *J Hepatol.* 79(2): 567-575. doi: 10.1016/j.jhep.2023.02.030.
  21. Riffenburgh RH. (2020). *Statistics in Medicine*. 4th ed. Amsterdam: Academic Press, Elsevier: 738. ISBN: 978-0-12-820297-5.
  22. Sasaki M, Ikeda H, Haga H, Manabe T, Nakanuma Y. (2005). Frequent cellular senescence in small bile ducts in primary biliary cirrhosis: a possible role in bile duct loss. *J Pathol.* 205(4): 451-459. doi: 10.1002/path.1729.
  23. Sasaki M, Ikeda H, Yamaguchi J, Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. (2010). Bile Ductular Cells Undergoing Cellular Senescence Increase in Chronic Liver Diseases Along With Fibrous Progression. *Am J Clin Pathol.* 133(2): 212-223. doi: 10.1309/ajcpwmx47treywzg.
  24. Stevens JP, Gupta NA. (2022). Recent Insights into Pediatric Primary Sclerosing Cholangitis. *Clin Liver Dis.* 26(3): 489-519. doi: 10.1016/j.cld.2022.03.009.
  25. Van Munster KN, Bergquist A, Ponsioen CY. (2024). Inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis: One disease or two? *J Hepatol.* 80(1): 155-168. doi: 10.1016/j.jhep.2023.09.031.
  26. Xiao M, Chen W, Wang C et al. (2017). Senescence and cell death in chronic liver injury: roles and mechanisms underlying hepatocarcinogenesis. *Oncotarget.* 9(9): 8772-8784. doi: 10.18632/oncotarget.23622.

#### Відомості про авторів:

**Дибя Марина Борисівна** – к.мед.н., ст.н.с. відділення дитячої гепатології та коморбідних захворювань у дітей ДУ «ВЦМД НАМН України». Адреса: м. Київ, вул. П. Майбороди, 8. <https://orcid.org/0000-0002-9463-7867>.

**Задорожна Тамара Данилівна** – чл.кор. НАМН України, д.мед.н., проф., зав. лабораторії патоморфології ДУ «ВЦМД НАМН України». Адреса: м. Київ, вул. П. Майбороди, 8. <https://orcid.org/0000-0003-2787-603X>.

**Березенко Валентина Сергіївна** – д.мед.н., проф., зав. каф. педіатрії №1 НМУ ім. О.О. Богомольця; зав. відділення дитячої гепатології та коморбідної патології в дітей ДУ ВЦМД НАМН України. Адреса: м. Київ, вул. П. Майбороди, 8. <https://orcid.org/0000-0002-3777-5251>.

Стаття надійшла до редакції 23.04.2025 р., прийнята до друку 10.09.2025 р.