



## Особенности пострезекционной регенерации гепатоцитов под влиянием внутрипеченочного введения цианокобаламина

А. А. Андреев, В. В. Шишкина, А. Ю. Лаптиева\*, А. А. Глухов, А. П. Остроушко  
ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»  
Минздрава России, Воронеж, Россия

Резекция печени в большинстве случаев остается единственным способом, позволяющим добиться увеличения продолжительности жизни и излечения пациентов с объемными образованиями печени. В клинической практике, с целью улучшения метаболических процессов печени используют гепатопротекторы, в состав многих из них входит витамин В<sub>12</sub>, активная форма которого способна стимулировать репаративную регенерацию.

**Цель** исследования – выявить морфологические особенности гепатоцитов и стромы резецированной печени при внутриорганном интраоперационном введении цианокобаламина, изучить влияние витамина В<sub>12</sub> на пролиферативную активность гепатоцитов.

**Материал и методы.** Эксперимент выполнен на 36 половозрелых самцах белых крыс линии Wistar. В трех опытных группах животных осуществляли типичную резекцию в объеме 70% от исходной массы печени, в 1-й опытной группе профилактика пострезекционной печеночной недостаточности не проводилась, во 2-й опытной группе непосредственно после резекции в сохраненные доли печени вводили 0.9% раствор хлорида натрия, в 3-й – витамин В<sub>12</sub> (в концентрации 200 мкг/мл). В контрольной группе резекция печени не проводилась. Животных выводили из эксперимента на 1-, 7- и 14-е сутки после операции, осуществляли взятие материала печени для морфологического исследования.

**Результаты.** Значительное увеличение количества двуядерных гепатоцитов к 14-м суткам исследования отмечалось в 3-й опытной группе. При изучении срезов печени, окрашенных по методике импрегнации серебром, количество ретикулярных волокон на 14-е сутки в 3-й опытной группе составляло более 90% от показателей контрольной группы, в 1-й и 2-й опытных – менее 80%. При иммуногистохимическом исследовании к 14-м суткам эксперимента наблюдалось повышение пролиферативной активности одноядерных и двуядерных гепатоцитов во всех опытных группах в сравнении с 1-ми сутками. На 14-е сутки после операции наибольший индекс пролиферации отмечался в 3-й опытной группе.

**Заключение.** Предложенный метод внутриорганного интраоперационного введения цианокобаламина позволяет повысить пролиферативную активность гепатоцитов, способствует увеличению количества клеток, вступающих в митотический цикл, обеспечивает восстановление структурной организации печени, ее анатомической и функциональной целостности.

**Ключевые слова:** резекция печени, гепатоциты, пролиферативная активность, цианокобаламин

### Features of Post-Resection Regeneration of Hepatocytes under the Influence of Intrahepatic Administration of Cyanocobalamin

© А. А. Андреев, В. В. Шишкина, А. Ю. Лаптиева\*, А. А. Глухов, А. П. Остроушко, 2021  
N.N. Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia

Liver resection in most cases remains the only way to achieve an increase in life expectancy and cure of patients with large liver formations. In clinical practice, hepatoprotectors are used to improve metabolic processes of the liver, many of them include vitamin B<sub>12</sub>, the active form of which is able to stimulate reparative regeneration.

**The aim** of the study was to identify morphological features of hepatocytes and the stroma of the resected liver during intra-organ intraoperative administration of cyanocobalamin to study the effect of vitamin B<sub>12</sub> on the proliferative activity of hepatocytes.

**Material and methods.** The experiment was conducted on 36 male Wistar rats. In 3 experimental groups of animals, a typical resection was performed in the volume of 70% of the initial liver mass, in the 1st experimental group, prevention of post-resection liver failure was not carried out, in the 2nd experimental group, 0.9% sodium chloride solution was injected into the preserved liver lobes after resection, in the 3rd-vitamin B<sub>12</sub>. In the animals of the 1st control group liver resection was not performed. The animals were removed from the experiment in 1, 7 and 14 days after the operation and liver material was selected for morphological examination.

**Results.** A significant increase in the number of binuclear hepatocytes was noted in the animals of the 3<sup>rd</sup> experimental group in 14 days. When studying liver sections stained with silver impregnation after 14 days of the study, the number of reticular fibers in the animals of the 3<sup>rd</sup> experimental group was 90% higher than similar parameters in animals of the 1<sup>st</sup> control group, in the animals of the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> experimental groups it was less than 80%. In the immunohistochemical study, an increase in the proliferative activity of mononuclear and binuclear hepatocytes was observed in all experimental groups by the 14th day of the experiment compared with the

1<sup>st</sup> day. On the 14<sup>th</sup> day after the operation, the highest proliferation index was observed in the animals of the 3<sup>rd</sup> experimental group.

**Conclusion.** The proposed method of intra-organ intraoperative administration of cyanocobalamin increases the proliferative activity of hepatocytes, increases the number of cells entering the mitotic cycle, and restores the structural organization of the liver, its anatomical and functional integrity.

**Key words:** liver resection, hepatocytes, proliferative activity, cyanocobalamin

**\*Автор для переписки:**

Лаптиева Анастасия Юрьевна  
Воронежский государственный медицинский университет  
им. Н.Н. Бурденко, ул. Студенческая, 10, г. Воронеж,  
394036, Российская Федерация

**\*Corresponding author:**

Anastasiya Laptieva  
N.N. Burdenko Voronezh State Medical University, ul.  
Studencheskaya, 10, Voronezh, 394036, Russian Federation  
E-mail: laptievaa@mail.ru

## Введение

Хирургическое лечение объемных образований печени является актуальной проблемой оперативной гепатологии, так как резекция, в большинстве случаев остается одним из оптимальных способов, позволяющих добиться увеличения продолжительности жизни и излечения пациентов [3, 13].

На сегодняшний день в хирургической гепатологии наиболее широко используются типичные резекции печени [8, 11]. Как правило, при опухолевых и паразитарных заболеваниях применяются операции с удалением трех и более сегментов, что в большинстве случаев является причиной тяжелых осложнений и пострезекционной печеночной недостаточности [6, 9].

Однако, печень способна к быстрой регенерации в ответ на различные раздражители [14]. Кроме того, следует отметить наличие в печени достаточного функционального резерва, восприимчивого к активации [16]. Для улучшения обменных процессов печени в хирургической и терапевтической практике часто используют гепатопротекторы, в состав большинства из которых входит цианокобаламин [5, 7]. Доказано, что активная форма витамина В<sub>12</sub> участвует в синтетических процессах и трансметилировании нуклеиновых кислот, синтезе белка, углеводном и липидном обмене. Коферментная форма цианокобаламина – метилкобаламин, является одним из основополагающих компонентов для репликации и роста клеток, участвуя в регуляции метилирования ДНК. Первичным звеном является реметилирование гомоцистеина в метионин, происходящее в присутствии витамина В<sub>12</sub> – кофактора метионинсинтазной реакции [5, 7, 12]. Из образовавшегося метионина происходит формирование молекулы S-аденозилметионина (SAM), который представляет собой источник метильной группы для реакций метилирования ДНК. В дальнейшем, увеличение содержания 5-метилцитозина в ДНК приводит к уменьшению площади плотного примембранного хроматина в ядрах гепатоцитов регенерирующей

печени, что свидетельствует о его декомпактизации, разрыхлении и интенсификации процессов транскрипции [7]. Активация хроматина в ядрах клеток-мишеней в ДНК происходит под действием высоких доз витамина В<sub>12</sub>, также экспериментально подтвержден путь прямого метилирования ДНК при участии метилкобаламина.

Цель исследования – выявить морфологические особенности гепатоцитов и стромы резецированной печени при внутриорганным интраоперационном введении цианокобаламина, изучить влияние витамина В<sub>12</sub> на пролиферативную активность гепатоцитов.

## Материал и методы исследования

Исследования проводили на базе НИИ экспериментальной биологии и медицины ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко. Эксперимент выполнен на 36 половозрелых самцах белых крыс линии Wistar. В 3 опытных группах, каждая из которых включала 12 животных осуществляли анатомическую резекцию в объеме 70% от исходной массы печени согласно модели, предложенной G. Higgins и R. Anderson [18]. Операцию выполняли под внутримышечным наркозом с помощью препарата «Золетил-100». В качестве хирургического доступа использовали косой подреберный разрез от верхушки мечевидного отростка до свободного края XI ребра. Мобилизацию удаляемых долей осуществляли пересечением венозной связки. Предварительно выделенную сосудистую ножку перевязывали прошивной лигатурой. Левую и медиальную доли печени отсекали выше уровня наложенной лигатуры. В 1-й опытной группе профилактику пострезекционной печеночной недостаточности не проводили. Во 2-й опытной группе непосредственно после резекции осуществляли 10 инъекций в сохраненные доли печени по 0.1 мл 0.9% раствора хлорида натрия инсулиновыми шприцами на глубину 2–3 мм на расстоянии 5–7 мм друг от друга, в 3-й опытной группе выполняли 10 внутripеченочных инъекций по 0.1 мл цианокобаламина в концентрации 200 мкг/мл (патент RU2720451). Рану ушивали послойно: мышцы – простым обвивным швом, кожу – узловым. В качестве шовного материала на всех этапах использовалась полигидроксиацетиловая нить 4/0. В контрольной группе (группа интактных животных), которая включала в себя 4 животных, оперативное вмешательство не проводилось. У животных выполняли биопсию ткани печени иглой 18G под УЗ-контролем, по

завершению процедуры крысы были переданы в виварий. Животных опытных групп выводили из эксперимента на 1-, 7- и 14-е сутки после операции, по 4 крысы на каждый срок, соответственно.

Все манипуляции с лабораторными животными осуществляли в соответствии с принципами биоэтики, правилами лабораторной практики (GLP) и соответствовали международным рекомендациям (этическому кодексу) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985), с соблюдением принципов, изложенных в законе «О защите животных от жестокого обращения» гл. V, ст.104679 – ГД от 01.12.1999 г., и согласно приказу Минздрава России от 19.06.2003 г. № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики».

Во всех опытных группах осуществляли взятие фрагментов печени для морфологического анализа. Фиксация биоматериала проводилась в 10% нейтральном формалине. Протокол подготовки для морфологического анализа включала в себя классические протоколы гистологической техники с изготовлением парафиновых срезов толщиной 5 мкм для гистохимического окрашивания и 2 мкм для иммуноморфологического анализа. Для изучения морфометрических параметров гепатоцитов и оценки соотношения двуядерных и одноядерных клеток проводили окраску гематоксилином и эозином [2]. Общее количество анализируемых гепатоцитов у каждого животного составляло не менее 4500. Проводили подсчет количества одноядерных и двуядерных клеток и рассчитывали их соотношение для каждого из анализируемых участков ткани печени, без учета зонального строения печеночных долек. Для оценки количества ретикулярных волокон в интраорганный соединительной ткани срезы печени импрегнировали серебром [1]. Подсчет количества ретикулярных волокон осуществлялся с помощью программы ImageJ, рассчитывали общую площадь исследуемого фрагмента печеночной ткани и абсолютное содержание в ней ретикулярных волокон. Затем оценивали процент изменения количества ретикулярных волокон на разных сроках регенерации и сравнивали с показателями контрольной группы.

Оценку пролиферативной активности гепатоцитов осуществляли путем иммуногистохимической детекции с соблюдением необходимых процедур протокола [15] первичными кроличьими антителами (разведение 1:200). В качестве вторичных антител использовались козы антикроличьи антитела #AS-R1-HRP, визуализация которых проводилась реагентом ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrat Kit (#SK-4105) согласно инструкции производителя. Ядра контрастировали гематоксилином Майера, окрашенные срезы заключали в постоянную монтажную среду.

Срезы печени изучали на микроскопе ZEISS Axio Imager.A2 с системой документирования изображений, включающей цветную цифровую камеру Camera AxioCam 506 color. Полученные фотографии обрабатывали с помощью программы ZEN 2.3 (Carl Zeiss, Germany). Индекс пролиферации подсчитывали путем определения Ki-67-положительных ядер в одноядерных и двуядерных гепатоцитах. При этом высчитывали относительное содержание Ki-67-позитивных ядер гепатоцитов по отношению к их общему количеству в поле зрения. Для получения репрезентативной выборки общее количество анализируемых ядер гепатоцитов у каждого животного составляло не менее 4500.

Статистическая обработка выполнялась с помощью пакета «Описательная статистика» программы Excel, рассчитывали среднюю арифметическую, среднюю ошибку средней арифметической, стандартное отклонение. В связи с наличием более 30 экспериментальных животных выполнена оценка вида распределения. С помощью программы Statistica 6.0., функции Continuous distributions определяли подчиняются ли полученные данные нормальному распределению, для это проводили расчет медианы, моды, математического ожидания, среднеквадратического отклонения. На основании визуального анализа и результатов Chi-square test, так как P оказалась больше 0.05 (0.43850) был сделан вывод о том, что анализируемое распределение не отличается от нормального. В связи с этим, в исследовании использовались методы параметрической статистики. Для оценки достоверности различий использовали критерий сравнения Стьюдента. Достоверными считались различия при уровне значимости  $p < 0.05$ .

### Результаты и их обсуждение

При световой микроскопии и изучении морфометрических параметров гепатоцитов, на 1-е сутки исследования во всех опытных группах было выявлено наличие двуядерных и одноядерных клеток в соотношении 9:1, что соответствовало показателям контрольной группы. Наличие двуядерных гепатоцитов в печени, согласно литературным данным, является нормой, однако увеличение их количества в регенерирующих клетках может говорить либо о незавершенности митоза, либо о возникновении амитоза. В случае незавершенного митоза, который в норме может встречаться в 0.3–2.0% случаев, нарушение происходит в результате повреждения аппарата деления клетки или под воздействием внешних факторов. Деление останавливается, и клетка остается полиплоидной. Возникновение амитоза или прямого деления наблюдается в стареющих или патологически поврежденных клетках. Биологический смысл

Таблица 1

Соотношение одноядерных и двуядерных гепатоцитов в дольках печени, %<sup>1</sup>

Группа животных	Характеристика групп	1-е сутки		7-е сутки		14-е сутки	
		Количество ядер в клетках					
		1	2	1	2	1	2
Контрольная	Интактные животные	89.83 $\pm$ 2.21	10.17 $\pm$ 3.16				
1-я опытная	Типичная резекция печени (ТРП)	92.03 $\pm$ 5.27	7.97 $\pm$ 2.57	90.63 $\pm$ 4.23	9.37 $\pm$ 3.23	87.29 $\pm$ 6.05	12.71 $\pm$ 5.51*
2-я опытная	ТРП + инъекции 0.9% хлорида натрия	92.67 $\pm$ 3.89	7.33 $\pm$ 4.56	91.04 $\pm$ 4.56	8.96 $\pm$ 1.56	85.09 $\pm$ 7.52	14.91 $\pm$ 6.5
3-я опытная	ТРП + инъекции витамина В12	92.64 $\pm$ 6.28	7.36 $\pm$ 1.38	87.55 $\pm$ 3.7	12.45 $\pm$ 5.7	80.69 $\pm$ 6.16	19.31 $\pm$ 3.68**

Примечание: \* –  $p < 0.05$  при сравнении с группой интактных животных, \*\* –  $p < 0.05$  при сравнении с 1-ми сутками исследования; <sup>1</sup> – указано среднее значение и стандартное отклонение признака.

формирования гепатоцитов с двумя самостоятельными ядрами в одной клетке при репаративной регенерации заключается в создании резерва полиплоидизации [6]. При таком виде регенерации основным принципом является восстановление суммарного тканевого генома, что может достигаться двумя способами: полным делением клетки, увеличением геномов в клетке [6, 20]. С данной точки зрения полиплоидизация является эквивалентом клеточного размножения [6]. Полиплоидные клетки содержат более двух гомологических наборов хромосом, что теоретически может влиять на последующую регенерацию, однако недостаточно доказательств, устанавливающих прямые причинно-следственные связи между полиплоидией и нарушением хронического репаративного процесса [20]. Кроме того, следует отметить, что оставшаяся после резекции печень увеличивается в массе, чтобы компенсировать потерю ткани [17]. Таким образом, пострезекционная регенерация печени технически может являться ограниченным процессом компенсаторного роста [17].

В контрольной группе количество двуядерных гепатоцитов составляло 10.17 $\pm$ 3.16%. Сравнивая полученные результаты (табл. 1), к 14-м суткам исследования можно отметить повышение количества двуядерных клеток во всех опытных группах в сравнении с контрольной группой. Значительное увеличение количества двуядерных гепатоцитов отмечалось в 3-й опытной группе животных: на 7-е сутки данный показатель увеличивался на 63.82%, на 14-е сутки – на 112.36% в сравнении с 1-ми сутками. В 1-й и 2-й опытных группах количество двуядерных гепатоцитов на 7-е сутки превышало показатели на 1-е сутки на 17.57% и 22.24%, а на 14-е сутки – на 59.47% и 83.41% соответственно. Полученный результат демонстрирует значительное повышение пролиферативной активности печени после оперативного вмешательства. Подтверждается влияние цианокобаламина на пролиферативную активность гепатоцитов при резекции

печени, так как в 3-й опытной группе отмечалось наибольшее количество клеток, участвующих в митозе в сравнении с 1-й и 2-й опытными группами. Таким образом, можно предположить, что при введении витамина В<sub>12</sub> делению подвергаются не только молодые клетки, но и стареющие, которые без наличия стимулирующих факторов не вступили бы в митотический цикл (рис. 1).

При изучении срезов печени, окрашенных по методике импрегнации серебром, на 1-е сутки после резекции количество ретикулярных волокон в 1-й опытной группе составляло 37.71 $\pm$ 7.7% от показателей контрольной группы. Во 2-й опытной группе было на 8.14 $\pm$ 2.24%, а в 3-й опытной – на 1.43 $\pm$ 0.21% выше, чем в 1-й опытной группе. Максимальная пролиферативная активность наблюдалась с 3-х по 5-е сутки, со значительным восстановлением перипортальной и периферической областей дольки [19]. Наибольшее увеличение количества ретикулярных волокон отмечалось на 7-е сутки после операции, что наглядно демонстрирует возникновение репаративных процессов, затрагивающих как гепатоциты, так и соединительную ткань. Наибольшее количество ретикулярных волокон наблюдалось в 3-й опытной группе – 78.72 $\pm$ 5.70%. В 1-й и 2-й опытных группах данный показатель был ниже на 12.70 $\pm$ 2.04% и 19.80 $\pm$ 3.05%, соответственно. На 14-е сутки после резекции печени наблюдалось практически полное восстановление предоперационной морфологической структуры печени при внутривенном введении цианокобаламина. Количество ретикулярных волокон в 3-й опытной группе составляло 92.78 $\pm$ 1.24%, а в 1-й и 2-й опытных группах – на 13.76 $\pm$ 2.45% и 21.53 $\pm$ 3.11% ниже, соответственно. В эксперименте наблюдалась корреляция между повышением количества ретикулярных волокон и изменениями количества двуядерных и одноядерных гепатоцитов. Наблюдаемые максимальные показатели в 3-й опытной группе свидетельствовали об

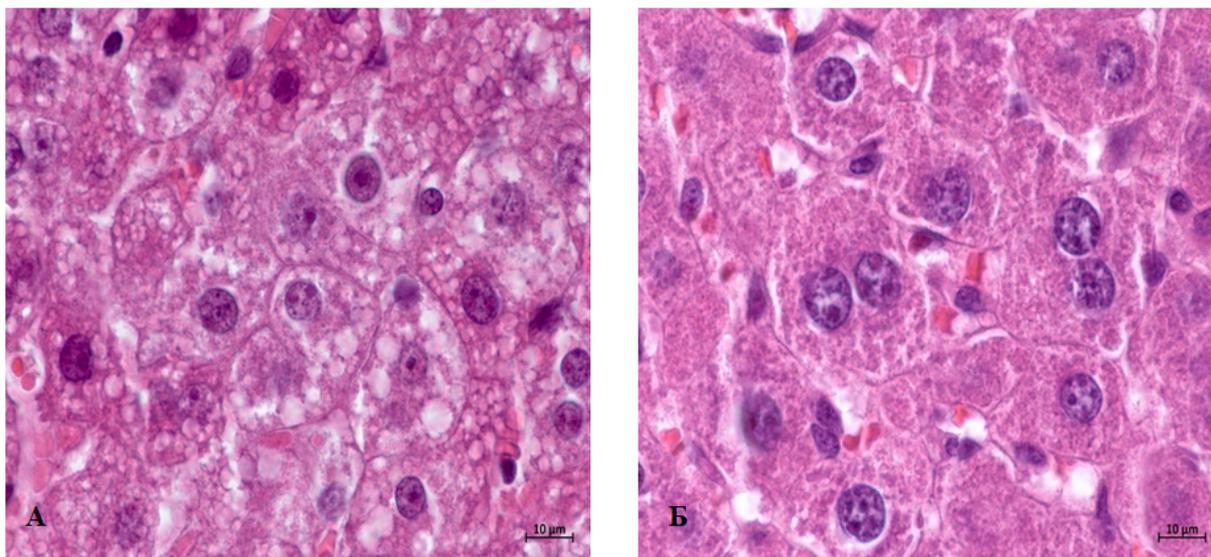


Рис. 1. Фрагмент печени крыс после типичной резекции печени. Обозначения: А – одноядерные гепатоциты животных интактной группы; Б – увеличение количества двуядерных гепатоцитов печени крыс на 1-е сутки с применением инъекции витамина В<sub>12</sub>. Фиксация в 10% нейтральном формалине. Окрашивание гематоксилином и эозином.

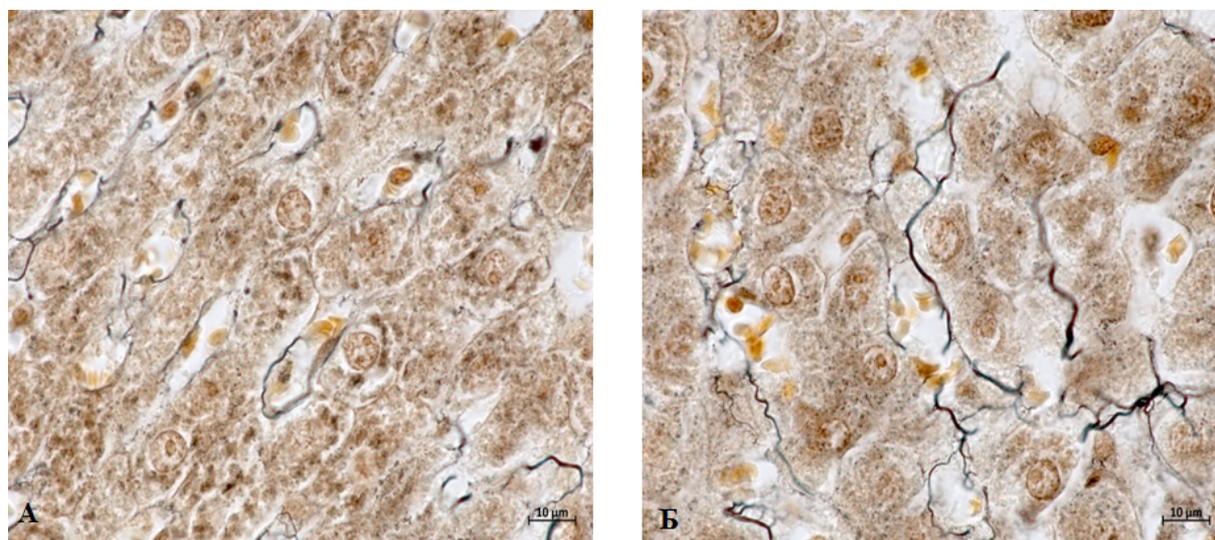


Рис. 2. Гепатоциты и внутридольковые ретикулярные волокна печени крыс. Обозначения: А – единичные ретикулярные волокна в поле зрения у животных контрольной группы на 7-е сутки после резекции; Б – значительное увеличение количества внутридольковых ретикулярных волокон в 3-й опытной группе на 7-е сутки после резекции. Фиксация в 10% нейтральном формалине. Импрегнация серебром.

интенсификации репаративных процессов в печени при внутриорганном введении цианокобаламина, восстановлении структурной организации печени. Полученные в ходе эксперимента результаты подтверждают отсутствие склонности к фиброзным изменениям печеночной ткани при стимуляции регенерации печени с помощью витамина В<sub>12</sub>, так как полученные морфологические показатели близки к результатам интактных животных (рис. 2).

При иммуногистохимическом исследовании печени интактных животных (контрольная группа) индекс пролиферации составил  $2.45 \pm 0.41\%$ . После анатомической резекции печени отмечалось повышение данного показателя как одноядерных, так и двуядерных гепатоцитов во всех опытных груп-

пах с 1-х по 14-е сутки эксперимента (табл. 2, 3). На 1-е сутки индекс пролиферации одноядерных гепатоцитов в 1-й опытной группе составлял  $2.19 \pm 0.52\%$ , во 2-й опытной группе –  $2.22 \pm 0.43\%$ , в 3-й опытной группе –  $5.97 \pm 0.34\%$ .

Во всех опытных группах животных наибольшая пролиферативная активность гепатоцитов отмечалась на 7-е сутки исследования, и составляла в 1-й опытной группе –  $2.78 \pm 0.21\%$ , во 2-й опытной группе –  $2.64 \pm 0.58\%$ , в 3-й опытной группе –  $6.54 \pm 0.71\%$ . Полученный результат связан с тем, что пик митотической и активности гепатоцитов наблюдался с 2-х по 5-е сутки после резекции печени [10]. Это связано с тем, что в результате механического повреждения печеночной ткани запускается каскад регенера-

Таблица 2

**Индекс пролиферации одноядерных гепатоцитов, %<sup>1</sup>**

Сроки исследования	Группы исследования (характеристика групп)			
	Контрольная группа (интактные животные)	1-я опытная группа (типичная резекция печени /ТРП/)	2-я опытная группа (ТРП + инъекции 0.9% хлорида натрия)	3-я опытная группа (ТРП + инъекции витамина В <sub>12</sub> )
1-е сут	2.45±0.41	2.19±0.52	2.22±0.43	5.97±0.34 <sup>*,**</sup>
7-е сут	–	2.78±0.21	2.64±0.58	6.54±0.71 <sup>*,**</sup>
14-е сут	–	2.54±0.29	2.56±0.45	6.22±0.54 <sup>*,**</sup>

Примечание: \* –  $p < 0.05$  при сравнении с группой интактных животных, \*\* –  $p < 0.05$  при сравнении с 1-й группой животных; <sup>1</sup> – указано среднее значение и стандартное отклонение признака.

Таблица 3

**Индекс пролиферации двуядерных гепатоцитов, %<sup>1</sup>**

Сроки исследования	Группы исследования (характеристика групп)			
	Контрольная группа (интактные животные)	1 опытная группа (типичная резекция печени /ТРП/)	2 опытная группа (ТРП + инъекции 0.9% хлорида натрия)	3 опытная группа (ТРП + инъекции витамина В <sub>12</sub> )
1-е сут	0.032±0.015	0.033±0.019	0.011±0.006	0.063±0.016 <sup>*,**</sup>
7-е сут	–	0.038±0.017	0.024±0.011	0.089±0.051 <sup>*,**</sup>
14-е сут	–	0.038±0.027	0.021±0.017	0.069±0.024 <sup>*,**</sup>

Примечание: \* –  $p < 0.05$  при сравнении с группой интактных животных, \*\* –  $p < 0.05$  при сравнении с 1-й группой животных; <sup>1</sup> – указано среднее значение и стандартное отклонение признака.

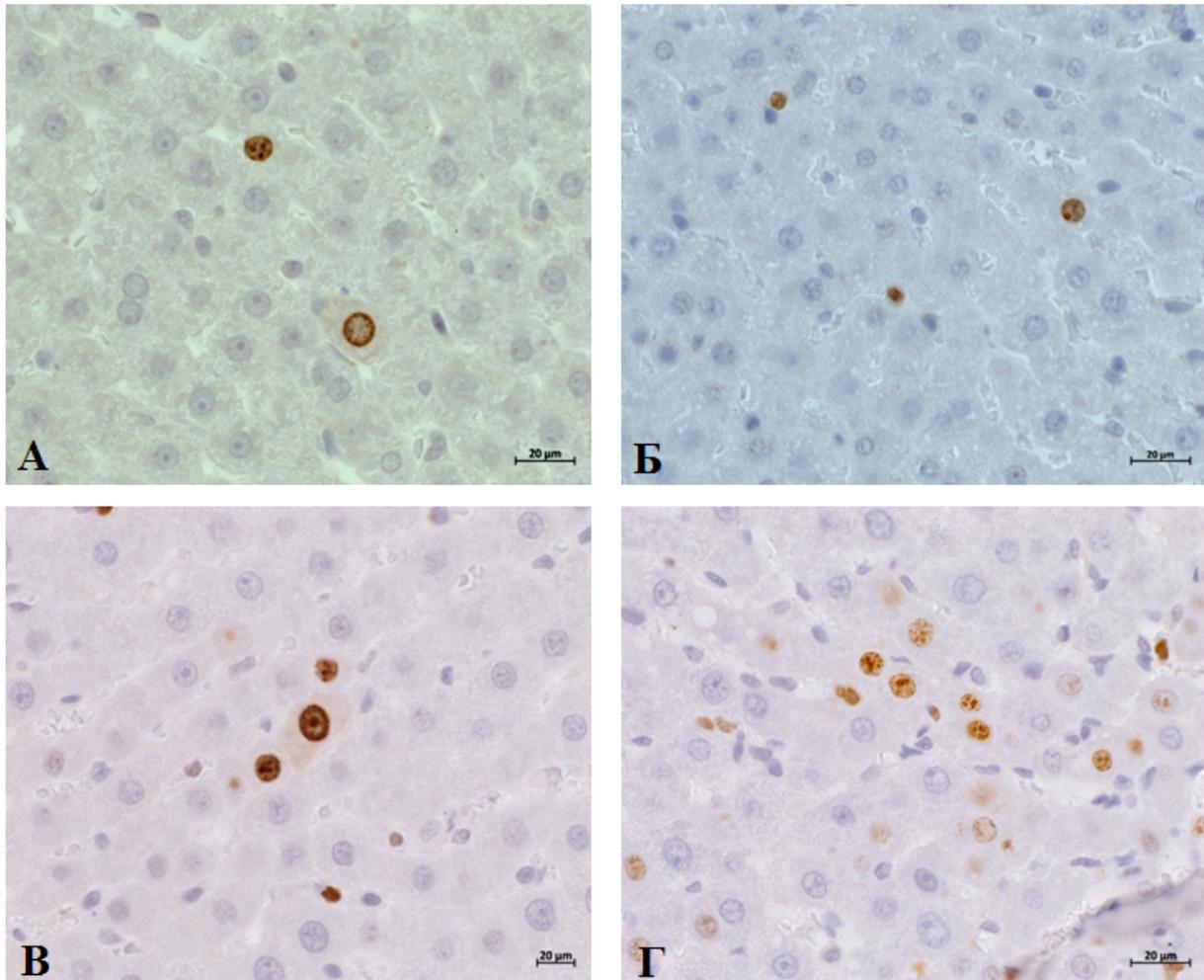


Рис. 3. Динамика пролиферации гепатоцитов печени крыс. Обозначения: А – Ki-67-позитивные ядра гепатоцитов интактных животных; Б – динамика пролиферации гепатоцитов после типичной резекции печени, 7-е сутки; В – экспрессия Ki-67 в ядрах гепатоцитов после типичной резекции печени с добавлением инъекции 0.9% хлорида натрия, 7-е сутки; Г – пролиферативная активность гепатоцитов после типичной резекции печени с применением витамина В<sub>12</sub>, 7-е сутки. Отмечается повышение пролиферативной активности гепатоцитов. Фиксация в 10% нейтральном формалине. Иммуногистохимическое выявление экспрессии маркера пролиферации Ki-67 (разведение 1:200).

торных механизмов, включая пролиферацию, дифференцировку, миграцию клеток, реструктуризацию стромы и ангиогенез [4]. При воздействии патогенного фактора происходит выработка перисинусоидальными клетками печени первичных митогенов (TGF, HGF, FGF, EGF), а также про- и противовоспалительных цитокинов, запускающих митотический цикл [4, 14]. На 14-е сутки после резекции печени статистически значимых различий индекса пролиферации в 1-й и 2-й опытных группах не отмечалось. Наибольшая пролиферативная активность наблюдалась в 3-й опытной группе (индекс пролиферации –  $6.22 \pm 0.54\%$ ), что подтверждает связь между метилированием ДНК с участием метилкобаламина, интенсификацией процессов транскрипции и скоростью пролиферации гепатоцитов. Незначительные различия в результатах, полученных в 1-й и 2-й опытных группах, как на 7-е, так и на 14-е сутки исследования, позволяют исключить влияние механического воздействия (инъекции паренхимы) на повышение пролиферативной активности клеток регенерирующей печени.

При оценке количества Ki-67-позитивных ядер в двуядерных гепатоцитах отмечалась аналогичная тенденция – увеличение индекса пролиферации после резекции печени во всех опытных группах (табл. 3). Наибольшие показатели наблюдались на 7-е сутки после операции: 1-я опытная группа –  $0.038 \pm 0.027\%$ , 2-я опытная группа –  $0.021 \pm 0.017\%$ , 3-я опытная группа –  $0.089 \pm 0.051\%$ . К 14-м суткам эксперимента индекс пролиферации составлял в 1-й опытной группе  $0.038 \pm 0.027\%$ , во 2-й опытной группе –  $0.021 \pm 0.017\%$ , в 3-й опытной группе –  $0.069 \pm 0.024\%$ . Индекс пролиферации в группе интактных животных (контрольная группа) –  $0.032 \pm 0.015\%$  (рис. 3).

Наличие наибольшего индекса пролиферации двуядерных гепатоцитов в 3-й опытной группе на 1-, 7- и 14-е сутки свидетельствует о вовлечении в процесс регенерации стареющих и малоактивных клеток, что также подтверждает влияние цианокобаламина на пролиферацию гепатоцитов и повышение их функциональной и митотической активности.

### Заключение

Предложенный метод внутривенного интраоперационного введения цианокобаламина позволяет повысить пролиферативную активность гепатоцитов, способствует увеличению количества клеток, вступающих в митотический цикл, обеспечивает восстановление структурной организации печени, ее анатомической и функциональной целостности.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы / References

1. Атякшин Д.А. Гистохимические подходы к оценке участия тучных клеток в регуляции состояния волокнистого компонента межклеточного матрикса соединительной ткани кожи. Журнал анатомии и гистопатологии. 2018;7(3):100–12 [Atyakshin DA. Histochemical approaches to the evaluation of the participation of mast cells in the regulation of the fibrous component of the intercellular matrix of skin connective tissue. Journal of Anatomy and Histopathology. 2018;7(3):100–12] (in Russian).
2. Атякшин Д.А., Бухвалов И.Б., Тиманн М. Гистохимия ферментов: методическое пособие. Воронеж: Научная книга; 2016 [Atyakshin DA, Bukhvalov IB, Timann M. Gistokhimiya fermentov: metodicheskoe posobie. Voronezh: Nauchnaya kniga; 2016] (in Russian).
3. Ахмедов С.М., Сафаров Б.Д., Расулов Н.А., Табаров З.В. Обширные резекции печени при осложнениях местнораспространенного рака печени. Анналы хирургической гепатологии. 2014;19(4):26–31 [Akhmedov SM, Safarov BD, Rasulov NA, Tabarov ZV. Extensive liver resections for complications of locally advanced liver cancer. Annals of HPB Surgery. 2014;19(4):26–31] (in Russian).
4. Василенко С.А., Мустафаева Э.Ш. Синусоидальные клетки печени как компоненты регенераторного потенциала печени. Синергия наук. 2017;(18):1118–25 [Vasilenko SA, Mustafaeva ESh. Sinusoidal liver cells as components of liver's regenerator potential. Sinergiya nauk. 2017;(18):1118–25] (in Russian).
5. Громова О.А., Стаховская Л.В., Торшин И.Ю., Филимонова М.В., Ковражкина Е.А. О потенциальном противоопухолевом эффекте витамина В12. Российский журнал боли. 2017;2(53):62–73 [Gromova OA, Stakhovskaya LV, Torshin IYu, Filimonova MV, Kovrazhkina EA. On the antitumor potential of vitamin B12. Russian Journal of Pain. 2017;2(53):62–73] (in Russian).
6. Дзидзава И.И., Слободяник А.В., Ионцев В.И. Осложнения после обширных резекций печени. Вестник Российской военно-медицинской академии. 2015;3(51):261–6 [Dzidzava II, Slobodyanik AV, Iontsev VI. Complications after extensive liver resections. Bulletin of the Russian Military Medical Academy. 2015;3(51):261–6] (in Russian).
7. Кляшева Р.И. Модуляция метилирования ДНК и реорганизация структуры хроматина под влиянием витамина В12 и адреналина у эукариот: автореф. дисс. докт. биол. наук. Рязань. 1996 [Klyasheva R.I. Modulyatsiya metilirovaniya DNK i reorganizatsiya struktury khromatina pod vliyaniem vitamina V12 i adrenalina u eukariot: avtoref. diss. dokt. biol. nauk. Ryazan'. 1996] (in Russian).
8. Кокудо Н., Кавагучи И. Резекция печени при метастатических опухолях (лекция). Анналы хирургической гепатологии. 2012;17(3):40–4

- [Kokudo T, Kavagucgi Yi. Liver resection for metastatic tumors (lecture). *Annals of HPB Surgery*. 2012;17(3):40–4] (in Russian).
9. Котельникова Л.П., Китаева И.Е., Будянская И.М. Резекции печени у больных с очаговыми заболеваниями на фоне диффузных поражений. *Медицинский альманах*. 2011;2:75–8 [Kotelnikova LP, Kitaeva IE, Budyanskaya IM. Hepatic resection among patients with focal diseases on the back of diffuse lesions. *Medical almanac*. 2011;2:75–8] (in Russian).
  10. Леонов С.Д., Панченков Д.Н., Алиханов Р.Б., Забозлаев Ф.Г., Иванов Ю.В., и др. Биоимпендансный анализ паренхимы печени при ее обширной резекции в эксперименте. *Анналы хирургической гепатологии*. 2014;19(1):55–9 [Leonov SD, Panchenkov DN, Alikhanov RB, Zabozlaev FG, Ivanov YuV, et al. Bio-impedance analysis of liver parenchyma after major liver resection in experimental setting. *Annals of HPB Surgery*] (in Russian).
  11. Пчелинцева Е.В. Динамика маркеров повреждения печени в крови после криорезекции по поводу очаговых поражений органа. *APRIORI. Серия: Естественные и технические науки*. 2015;(3):25 [Pchelinceva EV. The dynamics of markers of liver damage in blood after cryoresection about focal lesions. *APRIORI. Seriya: Estestvennye i tekhnicheskie nauki*. 2015;3:25] (in Russian).
  12. Ткач С.М. Восстановление уровня S-аденозил-L-метионина как эффективный патогенетический метод гепатопротекции. *Гастроэнтерология*. 2014;2:121–30 [Tkach S. M. Vosstanovlenie urovnya S-adenozil-L-metionina kak effektivnyi patogeneticheskii metod gepatoproteksii. *Gastroenterologiya*. 2014;2:121–30] (in Russian).
  13. Тупикин К.А. Пострезекционная печеночная недостаточность (факторы риска, профилактика, прогноз): автореф... дисс. канд. наук. Москва. 2017 [Tupikin KA. Postrezektsionnaya pechenochnaya nedostatochnost' (faktory riska, profilaktika, prognoz): avtoref... diss. kand. nauk. Moskva. 2017] (in Russian).
  14. Bhat M, Pasini E, Baciuc C, Angeli M, Humar A, Macparland S, et al. The Basis of Liver Regeneration: A Systems Biology Approach. *Annals of Hepatology*. 2018 Sep 18;17(5):0–10. doi: 10.5604/01.3001.0012.4890.
  15. Buchwalow IB, Boecker W. *Immunohistochemistry: Basics and Methods*. 1st ed. London, New York: Springer; 2010.
  16. de Miguel MP, Prieto I, Moratilla A, Arias J, Aller MA. Mesenchymal Stem Cells for Liver Regeneration in Liver Failure: From Experimental Models to Clinical Trials. *Stem Cells International*. 2019 May 2;2019:1–12. doi: 10.1155/2019/3945672.
  17. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology*. 2006;43(S1):S45–53. doi: 10.1002/hep.20969.
  18. Higgins GM. Experimental pathology of the liver. *Arch. Pathol.* 1931;12:186–202.
  19. Michalopoulos GK. Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology*. 2017 Mar 6;65(4):1384–92. doi: 10.1002/hep.28988.
  20. Zhang S, Lin Y-H, Tarlow B, Zhu H. The origins and functions of hepatic polyploidy. *Cell Cycle*. 2019 May 26;18(12):1302–15. doi: 10.1080/15384101.2019.1618123.

Поступила в редакцию 13.04.2021

Received 13.04.2021

Принята в печать 28.08.2021

Accepted 28.08.2021

*Для цитирования:* Андреев А.А., Шишкина В.В., Лаптиева А.Ю., Глухов А.А., Остроушко А.П. Особенности пострезекционной регенерации гепатоцитов под влиянием внутрипеченочного введения цианокобаламина. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2021; 10(3): 27–34. doi: 10.18499/2225-7357-2021-10-3-27-34

*For citation:* Andreev A.A., Shishkina V.V., Laptieva A.Yu., Glukhov A.A., Ostroushko A.P. Features of Post-Resection Regeneration of Hepatocytes under the Influence of Intrahepatic Administration of Cyanocobalamin. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2021; 10(3): 27–34. doi: 10.18499/2225-7357-2021-10-3-27-34