

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Воронежский государственный
медицинский университет имени Н.Н. Бурденко»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Лаптиёва Анастасия Юрьевна

**ПОСТРЕЗЕКЦИОННАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ ПЕЧЕНИ
ПРИ ИНТРАОПЕРАЦИОННЫХ ВНУТРИПЕЧЕНОЧНОМ
И ВНУТРИБРЮШИННОМ ВВЕДЕНИЯХ
ЦИАНОКОБАЛАМИНА И АДЕМЕТИОНИНА
(экспериментальное исследование)**

3.1.9. Хирургия

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Научный руководитель:
доктор медицинских
наук А.А. Андреев

Воронеж – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений и условных обозначений.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. Пострезекционная регенерация печени. Современное состояние проблемы (обзор литературы)	16
1.1. Виды резекций печени.....	17
1.2. Механизмы репаративной регенерации печени.....	19
1.3. Клиника и диагностика послеоперационной печеночной дисфункции...	28
1.4. Способы стимуляции регенерации печени.....	29
ГЛАВА 2. Материал и методы исследования.....	37
2.1. Общая характеристика и дизайн исследования.....	37
2.2. Структура исследования.....	39
2.3. Методика резекции печени.....	40
2.4. Устройство для инъекционного введения лекарственных препаратов	42
2.5. Лекарственный препарат «Цианокобаламин».....	44
2.6. Лекарственный препарат «Адеметионин»	45
2.7. Интраоперационное внутрибрюшинное введение цианокобаламина и адеметионина (I блок исследования)	45
2.8. Интраоперационное внутripеченочное введение цианокобаламина и адеметионина (II блок исследования)	46
2.9. Способ интраоперационного комбинированного введения цианокобаламина и адеметионина (III блок исследования)	46
2.10. Методы исследования.....	47
2.10.1. <i>Объективные методы исследования.....</i>	<i>47</i>
2.10.2. <i>Лабораторные методы исследования.....</i>	<i>48</i>
2.10.2.1. <i>Биохимический анализ крови.....</i>	<i>48</i>
2.10.2.2. <i>Иммуноферментный анализ.....</i>	<i>51</i>
2.10.3. <i>Морфологические методы исследования.....</i>	<i>51</i>
2.10.3.1. <i>Гистологические исследования.....</i>	<i>51</i>
2.10.3.2. <i>Иммуногистохимические исследования.....</i>	<i>52</i>
2.10.4. <i>Статистические методы исследования.....</i>	<i>53</i>

ГЛАВА 3. Оценка эффективности интраоперационного внутрибрюшинного введения цианокобаламина и адеметионина после резекции печени (I блок исследования)	56
3.1. Результаты объективных методов исследования.....	56
3.2. Результаты лабораторных методов исследования (биохимических, иммуноферментных).....	58
3.3. Результаты морфологических методов исследования (гистологических, иммуногистохимических).....	68
ГЛАВА 4. Оценка эффективности применения интраоперационного внутривенного введения цианокобаламина и адеметионина после резекции печени (II блок исследования).....	77
4.1. Результаты объективных методов исследования.....	77
4.2. Результаты лабораторных методов исследования (биохимических, иммуноферментных)	79
4.3. Результаты морфологических методов исследования (гистологических, иммуногистохимических)	90
ГЛАВА 5. Оценка эффективности применения способа интраоперационного комбинированного введения цианокобаламина и адеметионина после резекции печени (III блок исследования)	100
5.1. Результаты объективных методов исследования.....	100
5.2. Результаты лабораторных методов исследования (биохимических, иммуноферментных)	101
5.3. Результаты морфологических методов исследования (гистологических, иммуногистохимических)	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	118
ВЫВОДЫ.....	130
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	132
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	133
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	134

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЛТ – аланинаминотрансфераза;

АСТ – аспартатаминотрансфераза;

БЛ – общий билирубин;

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;

ГГТП – гаммаглутамилтранспептидаза;

ГЛ – глюкоза;

ГП – глутатионпероксидаза;

ГР – глутатионредуктаза;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ДНФГ-производные – 2,4-динитрофенилгидразин-производные;

КАГ – коэффициент атерогенности;

КР – креатинин;

ЛПВП – липопротеины высокой плотности;

ЛПНП – липопротеины низкой плотности;

ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности;

МДА – малоновый диальдегид;

МСК – мультипотентная стволовая клетка;

МЧ – мочевины;

ОБ – общий белок;

ОХ – общий холестерин;

СОД – супероксиддисмутаза;

ТГ – триглицериды;

ТК – тучные клетки;

ТРП – типичная резекция печени;

ЩФ – щелочная фосфатаза;

DNMT – ДНК-метилтрансфераза;

EGF – эпидермальный фактор роста;

GSH – SH-группы;

HGF – фактор роста гепатоцитов;
IGF – инсулиноподобный фактор роста;
IL – интерлейкин;
N – количество экспериментальных животных;
NaCl – хлорид натрия;
p – уровень статистической значимости показателя;
SAM – S-аденозилметионин;
TGF- α – трансформирующий фактор роста α ;
TGF- β – трансформирующий фактор роста β ;
TNF – фактор некроза опухоли;
VEGF – фактор роста сосудистого эндотелия.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Первичные и вторичные злокачественные новообразования, травмы печени встречаются более чем у 500 млн. человек в мире, из которых один миллион умирает ежегодно [14, 99]. Около 700 тыс. летальных исходов в год приходится на долю гепатоцеллюлярной карциномы и, согласно данным ВОЗ, отмечается тенденция к росту данного показателя [2, 6, 10, 80, 140]. Вторичные злокачественные новообразования печени встречаются у каждого четвертого онкологического пациента, при этом 60% из них показано выполнение резекции печени [12, 46, 96]. Число травматических повреждений органов брюшной полости также не имеет тенденции к снижению, кроме того, данная патология остается социально значимой, так как в возрасте до 40 лет сочетанные повреждения являются одной из ведущих причин смертности, нарушения трудоспособности и инвалидизации населения [65, 89, 146].

Для пациентов с очаговыми образованиями и травмами печени оперативное вмешательство остается ведущим методом радикального лечения [37, 46, 80, 118]. Несмотря на широкое применение консервативных подходов в гепатологии, внедрение миниинвазивных эндовидеолапароскопических и рентгенэндovasкулярных хирургических технологий, основным, и наиболее распространенным, методом лечения является резекция печени [36, 89]. В связи с особенностями топографии печени, сложностью обеспечения полноценного видеолапароскопического доступа к отдельным ее сегментам, основой хирургической гепатологии продолжают оставаться открытые вмешательства [75, 88].

Высокая летальность после обширных резекций печени чаще связана с кровопотерей, а также интоксикацией, обусловленной печеночной недостаточностью [88, 102]. Кроме того, функциональное состояние печеночной ткани в предоперационном периоде, наличие хронических

заболеваний печени также оказывают значительное влияние на сроки репаративной регенерации и реабилитации пациентов [36, 89]. На сегодняшний день пострезекционная печеночная недостаточность, по данным литературы, встречается в 32–60% наблюдений и риск ее развития связан с несколькими факторами [12, 80, 81, 97]. Прежде всего, это дисфункция паренхимы печени, которая может быть обусловлена исходными дистрофическими или цирротическими изменениями, гипоксией циркуляторного, гемического или смешанного характера, недостаточным оставшимся объемом печеночной ткани, повреждением желчных протоков [14, 59, 102].

Таким образом, на современном этапе развития медицины, поиск новых методов стимуляции репаративной регенерации печени остается актуальной задачей хирургии, решение которой позволит сократить сроки регенерации печеночной ткани, снизить риск развития послеоперационной печеночной недостаточности, сократить сроки госпитализации и реабилитации после обширных резекций.

Степень разработанности темы исследования

Операции на печени являются травматичными и технически сложными, что обусловлено обширным повреждением печеночной ткани с выраженной реакцией организма, а также возможностью развития тяжелых интра- и послеоперационных осложнений в 6–36% случаев [30, 50, 97, 98].

На сегодняшний день, в целях профилактики и лечения печеночной недостаточности при проведении пред- и послеоперационной терапии широко применяют различные гепатопротекторные препараты, в частности адеметионин, а также комплекс витаминов, в состав которых входит, в том числе, цианокобаламин [42, 74, 144]. Однако, существующие способы профилактики печеночной дисфункции, позволяющие активировать

пролиферацию гепатоцитов в раннем послеоперационном периоде, зачастую обладают недостаточной эффективностью [35, 96, 111].

Цель исследования

Повышение эффективности пострезекционной регенерации печени интраоперационными внутripеченочным и внутрпбрюшпнным введениями цианокобаламина и адеметионина в эксперименте.

Задачи исследования

1. Разработать способ стимуляции пострезекционной регенерации печени, основанный на интраоперационных внутripеченочном и внутрпбрюшпнном введениях цианокобаламина и адеметионина, и устройство для его осуществления.

2. Изучить влияние внутрпбрюшпнных введений цианокобаламина и адеметионина на течение послеоперационного периода, динамику восстановления массы печени, лабораторных показателей, в т.ч. окислительного стресса, экспрессии факторов роста TGF- β 1 и IL-1 β , морфологические характеристики ткани печени.

3. Исследовать влияние внутripеченочного введения цианокобаламина и адеметионина на восстановление массы печени, ее функциональной активности, лабораторные показатели, в т.ч. окислительного стресса, факторы роста TGF- β 1 и IL-1 β , пролиферативную активность гепатоцитов, развитие фпброзных и воспалительных изменений.

4. Оценить эффективность способа внутripеченочного введения цианокобаламина дополненного внутрпбрюшпнным применением адеметионина, его воздействие на динамику синдромов цитолиза, холестаза, печеночно-клеточной недостаточности, окислительного стресса, экспрессии факторов роста TGF- β 1 и IL-1 β , морфологические характеристики ткани печени.

Научная новизна исследования

Разработан и экспериментально обоснован способ стимуляции пострезекционной репаративной регенерации печени, основанный на интраоперационном внутripеченочном введении цианокобаламина (патент RU 2720451 C1) и внутpибрюшинном применении адеметионина.

Разработано устройство для введения лекарственных препаратов (патент RU 213859 U1), позволяющее осуществлять внутripеченочное и внутpибрюшинное введения.

Показано, что разработанный способ внутripеченочного введения цианокобаламина с внутpибрюшинным применением адеметионина способствует нормализации биохимических показателей у всех животных, восстановлению массы печени после резекции к 14-м суткам на 8,67% больше, в сравнении с внутpибрюшинным введением обоих препаратов ($p < 0,05$).

Доказано, что применение после резекции печени внутripеченочного введения цианокобаламина приводит к снижению показателей цитолиза, холестаза, печеночно-клеточной недостаточности, повышению экспрессии TGF- β 1 и IL-1 β , росту пролиферативной активности гепатоцитов в 3,84 раза, восстановлению массы печени после резекции к 14-м суткам на 13,4% больше, в сравнении с внутripеченочным введением 0,9% раствора NaCl ($p < 0,05$).

Установлено, что интраоперационное внутripеченочное введение адеметионина (патент RU 2023129221 A) приводит к достоверному повышению показателей воспаления, цитолиза, холестаза и печеночно-клеточной недостаточности, снижению показателей антиоксидантной защиты, гистологически подтвержденному развитию фиброзных и воспалительных изменений ткани печени.

Теоретическая и практическая значимость

Разработан способ пострезекционной интраоперационной стимуляции репаративной регенерации печени с использованием цианокобаламина и адеметионина.

Разработано устройство, позволяющее осуществлять внутрипеченочное и внутрибрюшинное введения лекарственных препаратов.

Создана база литературных данных, отражающая современные сведения о пострезекционной печеночной недостаточности (свидетельство о государственной регистрации базы данных №2022622163).

Обоснована безопасность и эффективность интраоперационных внутрипеченочного и внутрибрюшинного введений цианокобаламина, внутрибрюшинного применения адеметионина с помощью разработанного устройства при резекции ~ 70% массы печени.

Получены результаты, демонстрирующие, что внутрипеченочное введение адеметионина оказывает угнетающее воздействие на гепатоциты (снижение количества митозов на 48,38%) и стимулирующее – на фибробласты (развитие фиброзных и цирротических изменений печени).

Доказана высокая эффективность внутрипеченочного введения цианокобаламина с внутрибрюшинным применением адеметионина, что подтверждается восстановлением печени до 95,04% от исходной массы к 14-м суткам после ее резекции, отсутствием фиброзных и воспалительных изменений, в сравнении с внутрибрюшинным введением обоих препаратов.

Методология и методы исследования

Научная работа представляет собой проспективное рандомизированное экспериментальное исследование. Объектом исследования явилась разработка способа стимуляции репаративной регенерации печени интраоперационными внутрипеченочным и внутрибрюшинным введениями цианокобаламина и адеметионина, и изучение эффективности его

применения. Для решения поставленных задач предложен дизайн исследования с использованием следующих методов: объективных, лабораторных (биохимических, иммуноферментных), морфологических (гистологических, иммуногистохимических) и статистических. Животные были стандартизированы по полу, возрасту и массе тела, общее количество животных составило 192 крысы линии Wistar (самцы). Исследование выполнено в трех блоках: в I блоке изучали влияние внутрибрюшинного введения цианокобаламина и адеметионина, во II блоке – внутрипеченочного, в III блоке – комбинированного введения данных препаратов на пострезекционную регенерацию печени.

Диссертационное исследование выполнено в соответствии с законодательством Российской Федерации, международными этическими нормами, принципами и правилами доказательной медицины, одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России.

Достоверность и обоснованность результатов

Достоверность и обоснованность результатов диссертационной работы обеспечиваются подробным и качественным анализом достаточного объема теоретического материала, в том числе, отечественных и зарубежных источников по теме исследования; достаточной численностью и репрезентативностью экспериментальных групп исследования; применением актуальных методов диагностики; количественным и качественным анализом эмпирических данных; подтверждением достоверности полученных результатов с использованием современных методов медицинской статистики.

Основные положения, выносимые на защиту

Применение разработанного способа внутрипеченочного введения цианокобаламина с внутрибрюшинным введением адеметионина

способствует нормализации биохимических показателей на 7-е сутки после резекции печени, купированию окислительного стресса, повышению IL-1 β на 108,45% и TGF- β 1 на 31,23%, пролиферативной активности гепатоцитов на 68,84%, что приводит к восстановлению массы печени после резекции к 14-м суткам на 8,67% больше, в сравнении с внутрибрюшинным введением обоих препаратов ($p < 0,05$).

Выполнение внутripеченочного введения цианокобаламина приводит к снижению показателей синдромов цитолиза и холестаза, восстановлению углеводного и жирового обменов, повышению экспрессии факторов роста, пролиферативной активности гепатоцитов в 3,84 раза, восстановлению массы печени после резекции к 14-м суткам на 13,4% больше, в сравнении с внутripеченочным введением 0,9% раствора NaCl ($p < 0,05$).

Внутripеченочное введение адеметионина приводит к повышению показателей цитолиза, холестаза и печеночно-клеточной недостаточности, снижению защитных антиоксидантных свойств, показателей IL-1 β и TGF- β 1, развитию фиброзных и воспалительных изменений, в сравнении с внутripеченочным введением 0,9% раствора NaCl ($p < 0,05$).

Применение разработанного устройства, позволяющего осуществлять внутripеченочное и внутрибрюшинное введение лекарственных препаратов с контролем глубины, скорости и давления раствора является методологически и технически обоснованным.

Личный вклад автора

Автор провел анализ отечественной и иностранной литературы, обобщил полученные результаты и составил базу данных по теме исследования. Диссертант является соавтором способа стимуляции репаративной регенерации печени и устройства для его осуществления. Автор выполнил исследования, посвященные изучению динамики и особенностей репаративной регенерации печени при интраоперационном

внутрипеченочном и внутрибрюшинном введениях цианокобаламина и адеметионина. Результаты экспериментальных исследований обобщены в трех главах диссертации. Диссертантом самостоятельно проведены анализ и статистическая обработка полученных данных, сформулированы выводы и практические рекомендации, которые полностью соответствуют содержанию диссертации; подготовлены к публикации статьи по теме диссертационной работы, представлены результаты исследования на научно-практических конференциях.

Отдельные этапы научного исследования выполнены диссертантом в рамках гранта Президента Российской Федерации по государственной поддержке ведущих научных школ (НШ-2552.2020.7, соисполнитель), Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, в рамках грантовой поддержки по программам «УМНИК» (договор №16803ГУ/2021, исполнитель) и «Студенческий стартап» (договор №1510ГССС15-L/8798, исполнитель). Вклад автора при проведении исследования, подготовке публикаций, актов внедрения и патентов превышает 90%.

Внедрение результатов исследования

Диссертация выполнена на кафедре общей и амбулаторной хирургии (заведующий кафедрой – д.м.н., профессор А.А. Глухов) ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России (ректор – д.м.н., профессор И.Э. Есауленко).

Результаты диссертации внедрены и используются в работе Научно-исследовательского института экспериментальной биологии и медицины (директор – к.м.н., доцент В.В. Шишкина), учебном процессе на кафедре общей и амбулаторной хирургии ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 3.1.9. Хирургия (медицинские науки), а именно: пунктам 4. «Экспериментальная и клиническая разработка методов лечения хирургических болезней и их внедрение в клиническую практику» и 6. «Экспериментальная и клиническая разработка современных высокотехнологичных методов хирургического лечения, в том числе эндоскопических и роботических».

Апробация работы

Отдельные этапы диссертационного исследования были доложены и обсуждены на 27 конференциях различных уровней, в том числе 14 международных: очно (Курск, 2019, 2021; Воронеж, 2021, 2022, 2023, 2024; Москва, 2022, 2023), онлайн (Китай, Харбин, 2021; Оренбург, 2022; Казахстан, Астана, 2022; Узбекистан, Андижан, 2022; Республика Беларусь, Минск, 2023). В 2022 году работа также была представлена на XXX Международном Конгрессе Ассоциации гепатопанкреатобилиарных хирургов стран СНГ (Москва, 2022), Всероссийском съезде хирургов (Москва, 2022). Апробация диссертации состоялась 5 марта 2024 года на межкафедральном совещании ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России.

Научное исследование отмечено 10 дипломами, в том числе, дипломами I степени Алмазовского молодежного медицинского форума (Санкт-Петербург, 2022), Международной научно-практической конференции молодых ученых медиков (Воронеж, 2022), Международного медицинского форума «Эстафета вузовской науки» (Москва, 2023), Всероссийской конференции молодых ученых «Современные тренды в хирургии» (Москва, 2023).

Проведенные изыскания в рамках диссертационной работы позволили автору стать победителем конкурсов Фонда содействия развитию малых

форм предприятий в научно-технической сфере по программам «УМНИК» (Москва, 2020) и «Студенческий стартап» (Москва, 2023), стать лауреатом премий Правительства и Министерства образования Воронежской области (2022, 2023).

Публикация результатов исследования в научной печати

По теме диссертации опубликованы 10 статей, из них 2 в базах данных Scopus и Web of Science, 3 – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, получены 2 патента РФ на изобретение (RU 2720451 C1, RU 2023129221 A), патент на полезную модель (RU 213859 U1); свидетельство о государственной регистрации базы данных №2022622163.

Связь с планом научных исследований

Работа выполнена согласно плану НИР ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н.Бурденко Минздрава России в рамках комплексной темы (номер государственной регистрации 121060700037-3).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 5 глав (в том числе обзор литературы, материал и методы исследования, 3-х глав, посвященных результатам собственных исследований), заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Текст диссертации изложен на 154 страницах компьютерного текста, иллюстрирован 35 рисунками и 40 таблицами. Список литературы включает 158 источников, в том числе 112 русскоязычных и 46 иностранных работ.

ГЛАВА I. ПОСТРЕЗЕКЦИОННАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ ПЕЧЕНИ. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

По данным ВОЗ, в ближайшее десятилетие травмы и злокачественные новообразования печени станут одной из ведущих причин нарушения трудоспособности и инвалидизации населения [54, 80]. На сегодняшний день, заболеваниями печени страдают более 500 млн. человек в мире, из которых один миллион умирает ежегодно, что наиболее часто связано с первичными и вторичными злокачественными новообразованиями, травмами печени [14, 99]. Около 700 тыс. летальных исходов в год приходится на долю гепатоцеллюлярной карциномы и, согласно данным ВОЗ, отмечается тенденция к росту данного показателя [6, 80, 97]. Вторичные злокачественные новообразования печени встречаются у каждого четвертого онкологического пациента, при этом 60% из них показано выполнение резекции печени или чрескожной абляции [6, 12, 51]. Наиболее подходящими кандидатами для выполнения резекции печени являются пациенты с единичными новообразованиями, компенсированной функцией печени, отсутствием портальной гипертензии [51, 80]. Хирургическое лечение очаговых образований и травм печени является актуальной проблемой гепатобилиарной хирургии, так как резекция печени, в большинстве случаев, остается единственным способом, позволяющим добиться излечения пациентов и улучшить отдаленные результаты [46, 72, 80, 93]. Следует отметить, что выживаемость больных напрямую связана с регенераторным потенциалом печеночной ткани, скоростью восстановления функциональной активности печени после резекции [51].

На сегодняшний день число травматических повреждений органов брюшной полости не имеет тенденции к снижению, кроме того, данная патология приобрела социальную значимость, что связано с тем, что в возрасте до 40 лет сочетанные повреждения занимают первое место среди причин

смерти [54]. Среди травм органов брюшной полости по частоте поражения печень занимает второе место, что составляет 36% от общего количества других ранений внутренних органов, из них около 1/3 составляют субкапсулярные гематомы и мелкие разрывы [36, 54]. Однако смертность возрастает с увеличением степени тяжести, так, повреждения печени VI степени наиболее часто приводят к летальному исходу [36, 54]. При закрытой травме печени летальность достигает 30-50%, ножевых ранениях – 12%, огнестрельных – 25% [36, 776, 82]. Следует отметить, что, повреждение печени часто сопровождается травматическим и геморрагическим шоком: при сочетанных поражениях – в 60-80%, изолированной травме – в 10-12% случаев [54,82]. Особую опасность представляют сочетанные повреждения печени с вовлечением крупных сосудов – летальность в данном случае составляет 71-96% [54, 82].

Несмотря на широкое применение консервативных методов лечения повреждений печени, внедрение миниинвазивных видеолапароскопических и рентгенэндоваскулярных технологий, основным и наиболее распространенным методом лечения при обширных повреждениях печени остается классическая лапаротомия и резекция пораженного участка [36,82]. Состояние печеночной ткани в предоперационном периоде, наличие хронических заболеваний печени оказывают значительное влияние на сроки репаративной регенерации и реабилитации пациентов [36, 56, 82]. Понимание механизмов восстановления печеночной ткани и разработка способов воздействия на пострезекционную регенерацию печени остается перспективным направлением гепатобилиарной хирургии, позволяющим улучшить результаты лечения не только травматических и опухолевых, но и токсических и инфекционных поражений органа [9, 56, 82, 98].

1.1. Виды резекций печени

На сегодняшний день клиницисты выделяют две основные методики резекции печени: типичную (анатомическую) и атипичную [8]. Типичная

анатомическая резекция предполагает удаление автономных по кровоснабжению и желчевыделению сегментов, когда линии рассечения паренхимы совпадают с межсегментарными и межсекторальными границами, благодаря чему возможным становится изолированное удаление отдельных сегментов печени [2, 20, 50, 66]. Атипичная резекция может быть периопухолевой, краевой, также возможны частичное удаление сегмента печени и энуклеация, при которых принципы сегментарности и автономности не учитываются [20, 66].

На сегодняшний день в клинической практике наиболее широко используются типичные резекции [35, 41, 79]. По мнению В.А. Вишневого и соавт., 2010, анатомические резекции, в сравнении с атипичными, при первичных и вторичных злокачественных новообразованиях печени увеличивают частоту достижения адекватного отступа от края опухоли, повышая процент безрецидивной выживаемости больных [3, 93]. Следует отметить, что при травмах, опухолевых и паразитарных заболеваниях печени применяются операции с удалением трех и более сегментов [21, 45, 81]. При удалении до 40% объема печеночной ткани значимый функциональный дефицит не развивается, однако репаративные процессы идут медленно [48, 89]. При одномоментной резекции 70–75% от массы органа наблюдается быстрое восстановление анатомической и функциональной целостности печени; при резекции более 80% – снижение синтеза первичных и вторичных митогенов, десинхронизация вступления клеток в митоз, нарушение репликации ДНК и, как следствие, отсутствие регенерации [14, 48, 72, 101].

Таким образом, в связи с необходимостью проведения обширных вмешательств, пострезекционная регенерация печени остается одной из актуальных проблем современной гепатологии, особенно при резекции более 70% от исходной массы печени [34, 37]. По мнению некоторых авторов, в клинических условиях одномоментная резекция ~ 70% от исходной массы печени является максимально допустимой, удаление более 80% печеночной

ткани сопровождается высокой летальностью [42, 45, 65, 95, 96, 109, 112]. С целью изучения особенностей пострезекционной регенерации печени оптимальным способом моделирования является типичная резекция в объеме 70% от исходной массы печени, что с одной стороны позволяет продемонстрировать особенности течения пострезекционной регенерации печени, а с другой – в большинстве случаев не приводит к декомпенсированным состояниям.

1.2. Механизмы репаративной регенерации печени

Регенерация печени с восстановлением ее функций и анатомической целостности является одним из критериев эффективности лечения в хирургической гепатологии [23, 42]. В настоящее время выявлены значительные регенераторные возможности печени, способность восстанавливаться после многократных резекций, в результате которых масса удаленной ткани может превышать исходную в 4 раза [31, 40]. Скорость, с которой печень человека регенерирует после обширной резекции, составляет около 50 граммов в сутки [27], а полное восстановление ее функциональной активности в среднем происходит за 4-6 месяцев, что варьирует в зависимости от сопутствующей патологии [40].

Регенерация печени может быть физиологической и репаративной. Физиологическая происходит относительно медленно, в то время как со скоростью репаративной не может сравниться ни один другой орган [4, 46, 80]. При этом наблюдается прямая зависимость между объемом резекции и уровнем пролиферативной активности гепатоцитов [3, 80].

Пострезекционная регенерация печени представляет собой последовательный, сложно регулируемый механизм [44, 92]. После резекции репаративный процесс складывается из двух основных фаз – пролиферации и гипертрофии [4,92]. При остром повреждении паренхимы регенерация печеночной ткани происходит за счет низкодифференцированных гепатоцитов, которые имеют неограниченную способность к делению [28, 88,

110]. Восстановление печени после резекции осуществляется за счет пролиферации и полиплоидизации гепатоцитов, что связано с влиянием множества факторов на их пролиферативную активность [87, 88]. Индукторами митотической активности гепатоцитов при этом становятся: возросшая нагрузка на сохранившиеся клетки, гипоксия ткани печени, возникновение оксидативного стресса и развитие воспалительного ответа [57, 73]. В условиях воздействия повреждающего фактора происходит активация компенсаторно-приспособительных процессов, главными составными частями которых считаются митотическое деление, дифференцировка и миграция, а также реорганизация стромального компонента и новообразование сосудов [43, 154]. В случае невозможности пролиферации место гепатоцитов могут занимать стволовые клетки печеночного эпителия, которые дифференцируются для восстановления числа клеток печени [33, 104, 158]. Экспериментальные исследования показали, что митотическая активность гепатоцитов снижена в течение первых 24 часов после операции [47]. Ткань печени в этот период испытывает значительный энергетический недостаток, гепатоциты теряют запасы гликогена и накапливают липидные капли, что приводит к нарушению обменных процессов [42, 47]. Наряду с активацией пролиферации отмечается усиление апоптоза гепатоцитов, что связано с повреждением ДНК или веретена деления свободными радикалами кислорода, увеличение концентрации которых происходит в первые часы после резекции [25]. Однако, уже на 2-е сутки после операции регистрируют повышение митотической активности гепатоцитов и усиление синтеза ДНК [47]. Максимальная митотическая и функциональная активность гепатоцитов наблюдается между вторыми и пятыми сутками после резекции печени, что связано с тем, что в результате токсического повреждения запускаются последовательные регенераторные механизмы – пролиферация, дифференцировка и миграция клеток, реструктуризация стромы и ангиогенез

[78, 6, 85]. Отмечается реорганизация микроокружения – повышение количества тучных и купферовских клеток, активности коллагеназы и угнетение синтеза коллагена [7, 13]. Экспериментально показано, что после резекции печени также наблюдаются значительные изменения ее структуры, которые осуществляются в два этапа: 1) гиперплазия печеночных долек путем пролиферации клеток печени (до 4-х суток); 2) деление печеночных долек за счет ветвления желчных протоков, ветвей печеночной артерии, воротной вены и центральных вен (с 4-х по 7-е сутки) [6, 85].

При регенерации отмечается изменение ландшафта хроматина печеночных клеток, на который влияют метилирование ДНК, положение нуклеосом, модификация гистонов, а также внутри- и интерхромосомные взаимодействия [134]. Одной из особенностей пролиферации гепатоцитов после резекции в объеме ~ 70%, является относительно поздняя активация митотического деления и наличие двух пиков митотического индекса (более выраженного через 48–72 часа и менее выраженного через 7 суток после операции) [111]. Считается, что вступление гепатоцитов в митотический цикл индуцируют специфические факторы роста, концентрация которых через 1,0-1,5 часа после резекции печени в плазме крови повышается более чем в 20 раз, затем в течении 72 часов наблюдается «фаза плато», когда их концентрация поддерживается на одном уровне, а далее постепенно возвращается к нормальным значениям [13, 34, 87, 134]. Однако, при повреждении печеночной паренхимы гепатоциты становятся восприимчивыми к действию факторов роста только после того, как пройдут стадию прайминга – активацию, связывание с ДНК комплекса NFκB и других факторов транскрипции [30, 34, 134]. После этого, под воздействием первичных и вторичных митогенов гепатоциты претерпевают один или три цикла репликации, после чего возвращаются в состояние покоя [30, 34, 134]. Процесс репаративной регенерации регулируется факторами роста и цитокинами [30, 34]. Факторы роста представляют собой полипептиды с

молекулярной массой 5–50 кДа, которые могут оказывать биологическое влияние на клетки: стимулируют или ингибируют митогенез, хемотаксис, дифференцировку, оказывая действие по паракринному или аутокринному типам [34, 142]. В печени основными типами клеток, продуцирующих факторы роста, являются звездчатые, Купфера и Ито [52], при этом главными являются звездчатые клетки, которые не только участвуют в синтезе факторов роста, но и обеспечивают ремоделирование межклеточного матрикса, прямую дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток в гепатобласты и гепатоциты [52, 149]. После повреждения печеночной паренхимы происходит выброс активных веществ в клетках, наибольшее значение из которых при регенерации печени после резекции отводится экспрессии ряда интерлейкинов (IL-1b, IL-6, IL-10), а также факторам роста (HGF, TGF- β , TNF) [52, 59, 111, 122, 154].

Фактор роста гепатоцитов (HGF) – гликопротеин, обладающий наиболее выраженным митогенным действием на гепатоциты и участвующий в регенерации печени [29, 52]. Основными продуцентами HGF являются фибробласты, макрофаги, гладкомышечные клетки сосудистой стенки, эндотелиальные, звездчатые, Купфера и Ито [29, 53]. Резерв неактивной формы HGF в больших количествах содержится в матриксе соединительной ткани печени, особенно в перипортальной области печеночной доли [87]. Рецепторы к фактору роста гепатоцитов обнаружены, в том числе, на Т- и В-лимфоцитах, эпителиальных и тучных клетках [1, 52]. Экспериментально доказано, что экспрессия HGF увеличивается в организме при повреждении печени, с максимальной концентрацией на 5-е сутки [1, 105, 52]. После нанесения операционной травмы печени в плазме повышается уровень урокиназы, которая обеспечивает активацию каскада протеолитических реакций, способствующих деградации межклеточного матрикса и высвобождению HGF [87]. Повышение экспрессии HGF после повреждения печени

индуцирует ангиогенез, пролиферацию и миграцию клеток, ингибирует Fas-индуцированный апоптоз и развитие фиброза [52]. Кроме того, фактор роста гепатоцитов стимулирует пролиферацию некоторых типов эпителиоцитов, а также клеток сосудистого эндотелия и меланоцитов [87,52].

У пациентов, длительно страдающих заболеваниями печени, количество фактора роста гепатоцитов в сыворотке крови значительно возрастает [52, 105]. В эксперименте с моделированной острой печеночной недостаточностью было показано быстрое увеличение уровня фактора роста гепатоцитов в плазме крови во время ранней фазы ее регенерации [52, 105]. Противовоспалительное действие HGF выявлено на модели пострезекционной печеночной недостаточности, индуцированной 70% резекцией печени с однократным введением экзогенного фактора роста гепатоцитов, где установлено уменьшение воспалительного ответа в ранние сроки после операции [53]. Однако, несмотря на выраженные положительные эффекты, использование рекомбинантного HGF затруднено вследствие необходимости посттрансляционной модификации белка и малой биодоступности [34].

Трансформирующий фактор роста β (TGF- β) – один из основных регуляторных факторов, обладающий плеiotропным действием на широкий спектр клеток, включенных в различные физиологические и патофизиологические процессы, такие как эмбриогенез, канцерогенез, апоптоз, фиброгенез и иммунный ответ [17, 100]. Это также важный фактор, опосредующий клеточные процессы, включая рост клеток, дифференцировку, апоптоз и клеточный гомеостаз, участвующий в иммунных реакциях [147]. Описано 3 вида TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3), но только TGF- β 1 оказывает преимущественное влияние на клетки печени [100]. При повреждении печени эндотелиоциты, благодаря своей способности секретировать фибронектин, обеспечивают активацию звездчатых клеток, которые являются основным источником TGF- β 1 в

данном органе [22, 100,105]. Повышение концентрации TGF- β 1 приводит к миграции макрофагов в область повреждения и усилению синтеза ферментов, расщепляющих белки [67]. При участии урокиназы плазминоген трансформируется в активный плазмин, под влиянием которого активируется деградация белков базальной мембраны, происходит временное разрушение внеклеточного матрикса, создающее условия для миграции эндотелиоцитов и неоангиогенеза [67]. Гепатоциты имеют 3 типа рецепторов к TGF- β , которые действуют как активаторы митоза, усиливающие экспрессию матричной РНК [49, 134]. Результирующее действие TGF- β 1 зависит от его концентрации и дозы в крови, а также соотношения с другими регуляторными факторами [34, 49]. Кроме того, TGF- β 1 способен усиливать активность васкулоэндотелиального фактора роста, который обладает выраженными проангиогенными свойствами [76, 147]. Установлено, что при заболеваниях печени концентрация TGF- β 1 как в ткани, так и в плазме крови может быть различной [103, 56]. TGF- β 1 при трансплантации печени у детей рассматривается как индикатор формирования иммунной толерантности и биомаркер эффективности иммуносупрессивной терапии [49]. Установлено, что TGF- β 1 угнетает активность НК-клеток, Т- и В-клеточную пролиферацию, замедляет созревание и активацию макрофагов, лимфокинактивированных киллеров [73, 130]. TGF- β оказывает провоспалительное действие, связанное с вовлечением иммунных эффекторных клеток в очаг повреждения печеночной ткани, а также с повышением устойчивости их к апоптозу [49, 73, 130]. Таким образом, учитывая данные литературы, можно предположить, что TGF- β 1 в сыворотке крови дополнительно обеспечивает иммуносупрессивный и провоспалительный эффекты [49, 73]. Однако, в настоящее время не представлено однозначных клинических доказательств связи уровня TGF- β 1 в крови с развитием воспаления или характером иммуносупрессии [49, 73].

Эпидермальный (EGF) и трансформирующий- α (TGF- α) факторы роста – менее значимые факторы, повышающие пролиферативную активность гепатоцитов после резекции [87]. Предполагается, что EGF действует на ранних этапах регенерации печени, в то время как TGF- α – на более поздней стадии, так как активность его продукции достигает пика только через 24 часа после операции [87]. TNF- α образует регуляторную систему с IL-6, которая стимулирует в гепатоците экспрессию генов раннего ответа и приводит к вступлению клетки в митотический цикл [87, 111]. Кроме того, в настоящее время появились данные о том, что IL-6, совместно с TGF- α , могут индуцировать и потенцировать экспрессию HGF – основного фактора роста в печени [87].

Фактор некроза опухоли α (TNF- α) играет важное значение в процессе регенерации печеночной ткани, усугубляя, либо облегчая течение травмы печени [135, 148]. Продолжительная травма, вызванная токсинами или воспалительными факторами, приводит гепатоциты к хроническому окислительному стрессу, который может вызвать остановку клеточного цикла и истощение метаболических механизмов [32, 135]. Поврежденные гепатоциты в избыточном количестве секретируют TNF- α , который привлекает другие иммунные и воспалительные клетки [135, 148]. После того, как эти клетки отвечают, синтезируя большое количество TGF- β и тромбоцитарного производного факторов роста, перисинусоидальные, звездчатые и перипортальные клетки начинают дифференцировку в фибробласты, нарушая процесс регенерации [145]. Кроме того, высокий уровень TNF- α вызывает фосфорилирование ядерных белков и инактивацию митотического деления [32, 148]. В случае, если гепатоциты после повреждения сохраняют свою относительную целостность, то фибробластических преобразований не наблюдается [148].

Инсулиноподобный фактор роста (IGF) и фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) способны оказывать особое эндокринное действие [24,

94]. Низкие концентрации IGF стимулируют регенерацию, снижают выраженность фиброза печени, что способствует нормализации функционального состояния печени, уменьшению давления в системе воротной вены [67, 94, 24]. VEGF приводит к улучшению диффузии между синусоидами и печеночными клетками, обеспечивает поддержание метаболических процессов регенерирующей печени за счет новообразования сосудов системы микроциркуляции, уменьшения степени образования капилляров на уровне синусоидов, повышения количества пор в эндотелии и проницаемости эндотелиоцитов [67, 94].

Под влиянием митогенов печеночные клетки синхронно вступают в клеточный цикл [117]. Выделяют три основных его этапа – инициация, пролиферация и терминация [73]. В фазу инициации TGF- α дает гепатоцитам компетенцию перейти из состояния покоя в фазу G1 митотического цикла, но следует отметить, что если гепатоциты не подвержены воздействию необходимых метаболитов и факторов роста, то данный процесс является обратимым [117]. В фазу пролиферации происходит синтез ДНК и завершение клеточного деления, затем часть гепатоцитов переходит в состояние покоя, а другая часть снова вступает в митотический цикл [73]. Фаза терминации является частью восстановительного периода, в это время происходит уменьшение проростковых сигналов, повышение ингибиторной сигнализации и восстановление гомеостаза [73].

После активной пролиферации следует фаза гипертрофии, морфологически характеризующаяся увеличением размеров ядер и ядрышек, появлением в цитоплазме полирибосом и высокой степенью полиплоидии [117, 118]. Полиплоидизация наблюдается в результате того, что в первом цикле после репликации ДНК цитотомии не происходит, возникают двуядерные гепатоциты, в следующем митотическом цикле после удвоения ДНК деление ядер идет синхронно и возникают одноядерные тетраплоидные

клетки, далее наблюдается чередование этих двух циклов с постепенно возрастающей ploидностью гепатоцитов [15].

В интегральном процессе регенерации печени участвуют все клетки органа, выполняя свои клеточно-специфические функции и деление, а также вырабатывая межклеточные сигнальные молекулы для взаимной координации функций на каждом этапе процесса, что обеспечивает его строгую временную и пространственную организацию [68, 137]. Однако отмечается неравномерность распределения пролиферации по печеночной дольке [131, 143]. Портальная область дольки содержит больше митозов и синтезирующих ДНК клеток, чем остальные области, таким образом в перипортальной области пролиферация гепатоцитов наиболее интенсивна [131, 149]. При достижении печенью ее критической массы после резекции, снижается чувствительность клеток к регенерационным стимулам [13, 63, 149]. Окончание пролиферации гепатоцитов является комплексным процессом, находящимся под воздействием интегрин, и происходит при восстановлении печени до необходимой массы, определяемой потребностями организма [63, 131]. Восстановление первоначального размера печени возвращает гепатоциты в G₀-фазу клеточного цикла [63, 131]. Регенерация завершается, как только печень достигает исходной массы [131]. Количество гепатоцитов, образовавшихся в ходе пролиферации, превышает их первоначальное число, и небольшая волна апоптоза гепатоцитов завершает процессы восстановления печени после резекции, являясь механизмом коррекции избыточной пролиферации [11, 13, 63, 70, 131].

Таким образом, основными факторами роста, оказывающими влияние на митотическую активность гепатоцитов являются HGF и TGF- β 1. В связи с тем, что достоверное определение HGF в крови затруднено вследствие необходимости посттрансляционной модификации белка и малой биодоступности, а также высоких экономических затрат, наиболее часто применяют определение экспрессии TGF- β 1. Следует отметить, что TGF- β 1

– один из основных регуляторных факторов, обладающий плеiotропным действием и опосредующий клеточные процессы, включая рост клеток, дифференцировку, апоптоз и клеточный гомеостаз, участвующий в иммунных реакциях. Кроме того, после повреждения печеночной паренхимы происходит выброс активных веществ в клетках, наибольшее значение из которых при регенерации печени после резекции отводится IL-1 β , определение которого в крови также является показательным.

1.3. Клиника и диагностика послеоперационной печеночной дисфункции

Печеночная дисфункция впервые была определена как потенциально обратимое расстройство, возникающее в результате тяжелого повреждения печени и включающее признаки энцефалопатии, желтухи и коагулопатии, однако на сегодняшний день это определение подверглось некоторому пересмотру – оно продолжает подчеркивать потерю гепатоцеллюлярной функции, но при этом клиническая картина может быть не выраженной [53, 74, 91, 102, 152]. Дисфункция печени представляет собой широкий спектр патологических изменений, которые можно обнаружить при гепатите, холестазах, метаболических заболеваниях, очаговых поражениях печени, а также при операциях на печени и желчевыводящих путях [10, 62, 83, 139].

Современные авторы выделяют множество вариантов классификации и оценки тяжести печеночной дисфункции, наиболее широко применяемыми из которых являются: Metavir [117], Р.Т. Панченкова [95], В.П. Зиневича [68], Э.И. Гальперина [95, 68], В.Г. Истратова [76], В.Д. Федорова и В.А. Вишневого [95], ISGLS [123]; при тяжелой степени прибегают к использованию шкалы Чайлд–Пью [123].

Сложности диагностики связаны с тем, что в компенсированной и субкомпенсированной формах печеночная дисфункция не всегда проявляется при физикальных методах оценки состояния пациента [139, 152]. Данное состояние клинически не проявляется до поздних стадий, на

начальных этапах регистрируются лишь изменения в биохимическом анализе крови [139, 152]. Изменения в первую очередь проявляются повышением уровня трансаминаз, что на сегодняшний день считается «золотым стандартом» для оценки первичного повреждения клеток печени [75, 152]. На следующем этапе наблюдается повышение щелочной фосфатазы, гаммаглутамилтранспептидазы и общего билирубина, что связано с формирующимися метаболическими нарушениями и застоем желчи [75, 152]. Изменения со стороны общего анализа крови и коагулограммы при печеночной дисфункции часто встречаются лишь на поздних стадиях [139, 152]. Также с целью диагностики применяется инструментальная неинвазивная визуализация печеночной дисфункции: ультразвуковое исследование, в том числе с контрастированием; эластография; компьютерная томография, в том числе с динамическим усилением; магнитно-резонансная томография; оценка внеклеточного объема печени на МРТ [62, 143, 139, 152].

Таким образом, оценка функционального состояния печени в послеоперационном периоде должна носить комплексный характер. Следует отметить, что среди лабораторных исследований «золотым стандартом» является оценка биохимических показателей, а значения общего анализа крови и коагулограммы информативны при печеночной дисфункции лишь на поздних стадиях. Также применяется инструментальная неинвазивная визуализация печеночной дисфункции.

1.4. Способы стимуляции регенерации печени

На сегодняшний день раскрыты многие из фундаментальных сигнальных путей, контролирующих пролиферацию гепатоцитов, но учеными продолжается изучение механизмов, обеспечивающих инициацию и прекращение репаративной регенерации печени [126, 129, 144]. Следует отметить, что самыми мощными внутренними факторами регенерации печени являются компоненты системы гемостаза [144-147]. Среди внешних

факторов можно выделить следующие: лучевая, электрическая стимуляция, клеточная терапия и медикаментозное воздействие [122-141].

Одним из вариантов лучевой стимуляции является использование светодиода света (630 нм) после частичной гепатэктомии, что приводит к активации дыхательной активности митохондрий, биологическому стимулирующему эффекту на гепатоциты [134, 151]. Другим способом стимуляции печени является лазерное облучение дозой 70 Дж/см², 650 нм, 100 МВт, непосредственно на оставшуюся часть печени после резекции, что приводит к усилению пролиферативной активности гепатоцитов, не вызывая изменений на микроядерном уровне [121, 151].

Электрическая стимуляция печени также демонстрирует выраженную эффективность. Одним из вариантов электрического воздействия является применение наносекундного импульсного электрического поля [155]. Экспериментально доказано, что локальная печеночная абляция способствует значительной пролиферации гепатоцитов печени с повышением уровня HGF [155].

Клеточная терапия является одним из наиболее активно развивающихся направлений регенеративной медицины. С целью стимуляции восстановления печени после повреждений наиболее часто используют мультипотентные стволовые клетки (МСК) [47, 129, 158]. МСК мигрируют к поврежденным тканям, подвергаются гепатогенной дифференцировке, ингибируют высвобождение фактора воспаления и усиливают пролиферацию клеток печени даже в естественных условиях [127]. Таким образом, клеточная терапия на основе МСК может применяться для предотвращения как острого, так и хронического повреждений печени, однако имеет достаточно узкий спектр показаний к применению [127, 128].

Современные медикаментозные методы воздействия включают в себя, в частности, применение криопресипитата, фибриногена, гепатопротекторов и витаминов.

При применении криопреципитата отмечается выраженная стимуляция регенерации гепатоцитов (увеличение количества двуядерных и пролиферирующих клеток), однако первоначальная структура печени не восстанавливается [143].

Пункционное введение высококонцентрированного раствора фибриногена в пораженную циррозом печеночную ткань стимулирует ее регенерацию, однако также нарушает исходную архитектонику печеночной ткани [143].

В клинической практике с целью стимуляции восстановительных процессов в печени применяют гепатопротекторы и витамины, наиболее эффективными из которых являются адеметионин, фосфолипиды и витамины группы В [113, 133].

Адеметионин принимает участие в процессах трансметилирования и транссульфирования, которые жизненно необходимы для функциональной активности гепатоцитов [28, 86, 114]. Трансметилирование отвечает за метилирование мембранных фосфолипидов – реакцию, которая восстанавливает текучесть мембран и, следовательно, обеспечивает нормальную работу гепатоцитов [28, 113]. Путь транссульфирования приводит к синтезу таких соединений, как глутатион и таурин, которые участвуют в процессах детоксикации [113, 153]. Однако несмотря на то, что адеметионин включен в перечень препаратов, рекомендованных при заболеваниях печени, следует отметить, что в практической деятельности он показывает высокую активность при механическом повреждении печени, однако малоэффективен при монотерапии токсического гепатита [55, 113, 153].

Применение фосфолипидов с целью восстановления клеточных мембран клеток печени наиболее широко используется при неалкогольной жировой болезни печени и вирусных гепатитах, однако не влияет на

митотическую активность гепатоцитов, что ограничивает их применение при обширных механических повреждениях [146-157].

В терапии патологии печени витамины В₆, В₉, В₁₂ используют уже более 80 лет, однако именно витамин В₁₂ (цианокобаламин) – является «классическим гепатопротектором» [117, 134, 138, 156]. Экспериментально доказано выраженное влияние цианокобаламина на репаративную регенерацию печени и стимуляцию митотической активности гепатоцитов [39, 60].

Витамин В₁₂ участвует в процессах синтеза нуклеиновых кислот, репликации и роста клеток, способствует повышению регенераторных возможностей тканей, оказывает гемопоэтическое, обезболивающее и метаболическое действия [11, 19, 64, 84, 106]. Но наиболее важными его функциями считаются участие в обмене гомоцистеина и синтезе метионина, стимуляции процессов метилирования [26, 38, 119, 126]. Попадая в кровоток, витамин В₁₂ связывается с одним из транспортных белков (транскобаламином II), который доставляет его к гемопоэтическим клеткам костного мозга и в печень [19, 60, 116, 134, 156]. Цианокобаламин используется тканями только после его преобразования в печени в коферментные активные формы: метилкобаламин, принимающий активное участие в процессе метилирования ДНК, и дезоксиаденозилкобаламин, участвующий в образовании жирных кислот [5, 58, 126, 153, 156].

Метилкобаламин – одна из активных коферментных форм, принимающих участие в метаболических реакциях, обмене жиров и углеводов, синтезе ДНК [114, 126, 156]. Основная роль метилкобаламина в синтезе ДНК заключается в его участии в процессах метилирования, начальным этапом которого является реакция реметилирования гомоцистеина в метионин [71, 91, 124]. Гомоцистеин представляет собой промежуточный продукт трансметилирования и его высокая концентрация подавляет трансляцию, транскрипцию и ферментативную активность

основных ферментов антиоксидантной системы – супероксиддисмутазы и глутатион пероксидазы [77, 107, 114, 120]. Существует альтернативный путь биотрансформации гомоцистеина в организме человека – транссульфирование с участием фермента цистатионин-бета-синтазы, результатом которого является образование цистеина – аминокислоты, участвующей в процессах детоксикации и оказывающей антиоксидантное действие [61, 107, 115, 120]. Реметилирование гомоцистеина осуществляется путем образования метионинсинтазы и переноса метильных групп на гомоцистеин с образованием метионина [5, 71, 61, 107]. Метионинсинтаза представляет собой кобаламинзависимый фермент, витамин В₁₂ в данном случае является кофактором [107, 115]. Важную роль в процессе синтеза метионина также играют метилентетрагидрофолатредуктаза – фермент, принимающий участие в образовании метилтетрагидрофолата из метилентетрагидрофолата; метионинсинтаза-редуктаза, способствующая восстановлению кофактора метионинсинтазы кобаламина I из окисленной формы кобаламина II [61]. В качестве донора метильной группы в данной реакции выступает метилтетрагидрофолат [132]. В результате действия метионинсинтазы происходит перенос донорских метильных групп на гомоцистеин и образование метионина [61]. Описанный путь реметилирования является основным, наиболее часто встречающимся в клетках печени [132]. Небольшое количество гомоцистеина посредством метионил-тРНК-синтетазы может превращаться в тиолактон, что предотвращает включение гомоцистеина вместо метионина в состав аминоксил-тРНК и его участие в трансляции [61].

Получающийся из гомоцистеина метионин преобразуется в S-аденозилметионин (SAM), основной функцией которого и является участие в реакциях трансметилирования [108, 144]. S-аденозилметионин – основная молекула-источник метильной группы для реакций метилирования ДНК [71].

В клетках млекопитающих содержатся три активных ДНК-метилтрансферазы: DNMT-1, DNMT-3a и DNMT-3b, которые катализируют перенос метильной группы с S-аденозилметионина на атом C5 основания цитозина [16, 71, 108, 156]. Метилирование ДНК и модификация гистонов определяют динамику состояния хроматина и оказывает влияние на его структуру [71, 120]. Процесс метилирования ДНК заключается в добавлении метильной группы к цитозину в положении C5 с образованием 5-метилцитозина в пределах CpG (цитозин/гуанин) пары, при этом наблюдаются изменения в ряде характеристик ДНК: увеличение шага спирали ДНК и увеличение ее гидрофобности [16, 120]. Данный процесс играет ключевую роль в эффективности взаимодействия белков с соответствующими участками ДНК, которые оказывают прямое воздействие на транскрипцию гена [40, 47]. Предполагается, что процесс метилирования осуществляется в первые минуты после репликации ДНК, т.е. пострепликативно и метилируются здесь те гены, работа которых была необходима клетке на предыдущей стадии дифференцировки [47]. Наименьшая суммарная активность метилаз наблюдается в G1 фазе клеточного цикла, затем увеличивается к S-фазе и опять падает в фазе G2 [107]. Кроме того, существует поддерживающее метилирование, которое осуществляется при полуконсервативной репликации. Данный процесс обеспечивает узнавание полуметилированных CpG – динуклеотидов во время репликации или сразу после нее, а также метилирование основания цитозина в дочерней цепи [84]. Многие генетические процессы в клетке, такие как репликация, транскрипция, репарация ДНК находятся под контролем метилирования ДНК, кроме того, данная реакция является одним из механизмов дифференцировки клеток и тканей [18].

Также можно отметить значительное влияние метилирования ДНК на структуру хроматина [18, 39]. Известно, что хроматин существует в двух основных состояниях: деконденсированном (эухроматин, который содержит

основную массу активно экспрессирующихся генов) и конденсированном (гетерохроматин, который содержит незначительное количество генов, представлен в основном повторяющимися последовательностями) [18, 39, 58]. Метилирование ДНК участвует в изменении структуры хроматина и приводит к отсутствию экспрессии генов при наличии их структурных нарушений [39, 69]. Было сделано обоснованное предположение, что именно неметилированные цепочки ДНК наиболее подвержены мутагенезу, что, в свою очередь, приводит к перерождению клеток в раковые [18].

Несмотря на то, что в большинстве случаев метилирование ДНК приводит к повышению содержания в клетке гетерохроматина, экспериментально доказано, что увеличение содержания 5-метилцитозина в ДНК приводит к уменьшению площади плотного примембранного хроматина в регенерирующей печени, следовательно, происходит декомпактизация, разрыхление хроматина, он становится более активным [39, 58, 90, 141]. Активация хроматина в ядрах клеток-мишеней в ДНК наблюдается под действием высоких доз витамина В₁₂, также экспериментально подтвержден путь прямого метилирования ДНК при участии метилкобаламина [18, 39, 58, 69]. Кроме того, метионин стимулирует пролиферацию гепатоцитов, что проявляется выраженным регенерирующим эффектом в отношении клеток печени [52, 107, 150].

Экспериментально доказано, что дотации витамина В₁₂ имеют отчётливый гепатопротекторный эффект: наблюдается снижение уровня аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы; отмечается ингибирование образования коллагеновых фибрилл при химическом повреждении печени [19, 26, 107, 108]. Цианокобаламин входит в состав многих гепатопротекторов, которые включены в схемы комплексной терапии заболеваний гепатобилиарной системы и сочетанной патологии [61, 110, 136, 141].

Таким образом, на сегодняшний день существует множество способов стимуляции репаративной регенерации печени, такие как лучевая, электрическая стимуляция, клеточная терапия, медикаментозное воздействие. Однако применение лучевой и электрической стимуляции чаще всего ограничено, в связи с необходимостью наличия специализированного оборудования, а клеточная терапия продолжает находиться на этапе разработки. Именно поэтому основным способом воздействия является медикаментозный, с применением гепатопротекторов, в частности адеметионина, и витаминных препаратов, прежде всего цианокобаламина.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общая характеристика и дизайн исследования

Объектом исследования явилась разработка способа стимуляции пострезекционной пролиферации гепатоцитов путем интраоперационного внутripеченочного и внутрпбрюшинного введений цианокобаламина и адеметионина, устройства для их осуществления и изучение эффективности экспериментального использования.

Работа представляет собой проспективное рандомизированное исследование, выполненное на базе Научно-исследовательского института экспериментальной биологии и медицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Исследования проведены в экспериментальных условиях на половозрелых самцах белых лабораторных крыс линии Wistar. Все манипуляции с лабораторными животными осуществляли в соответствии с принципами биоэтики, правилами лабораторной практики (GLP), требованиями ФЗ РФ от 14.05.1993 N 4979-1 «О ветеринарии» (с изменениями от 02.07.2021), директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза «О защите животных, используемых в научных целях», ГОСТа №33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами», ГОСТа 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур», ГОСТа 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Проведение исследования одобрено локальным Этическим комитетом ФГБОУ ВГМУ им. Н.Н.Бурденко Минздрава России. Животные были стандартизированы по полу (самцы), возрасту ($8,5 \pm 2,1$ мес.) и массе тела (284 ± 28 г). Общее

количество животных составило 192. Исследование выполнено в трех блоках: в I блоке изучали влияние внутрибрюшинного введения цианокобаламина и адеметионина, во II блоке – внутripеченочного, в III блоке – комбинированного введения данных препаратов на пострезекционную регенерацию печени. Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

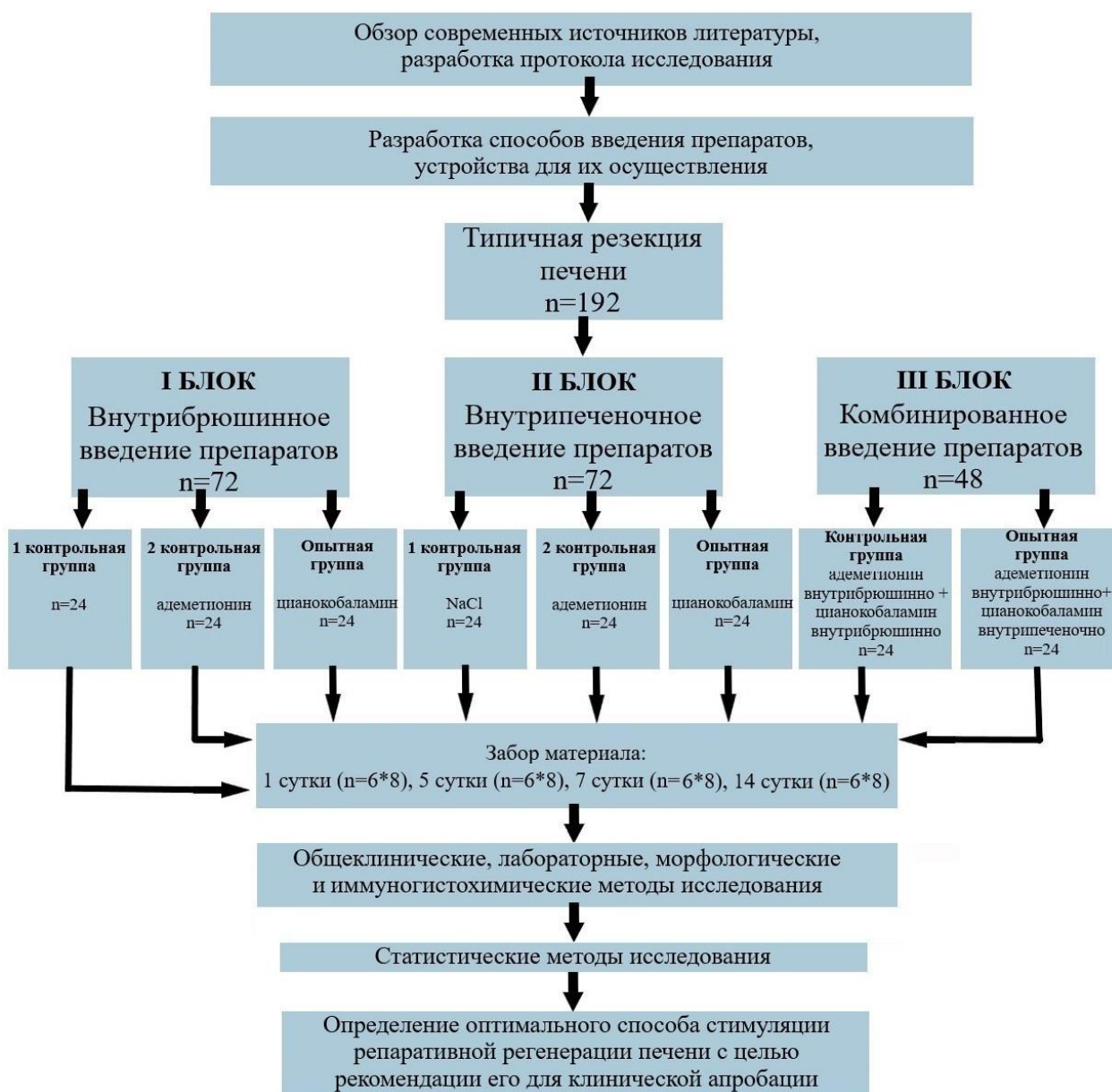


Рисунок 1 – Дизайн исследования

На 1, 5, 7 и 14-е сутки после резекции печени выполняли гепатэктомии, проводили забор крови, выводили животных из эксперимента.

2.2. Структура исследования

Эксперименты выполнены на 192 половозрелых самцах крыс линии Wistar, которым выполняли типичную резекцию печени (ТРП) ~ 70% исходного объема печени, согласно модели, предложенной G. Higgins и R. Anderson [125]. Рандомизация животных осуществлялась с использованием метода конвертов.

Исследование проведено в трех блоках, 8 группах – 5 контрольных, 3 опытных (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика блоков и групп исследования

Группа исследования	Характеристика группы	Количество животных
<i>I блок исследования (внутрибрюшинное введение препаратов)</i>		
1 контрольная	Типичная резекция печени (ТРП)	24
2 контрольная	ТРП + внутрибрюшинное введение адеметионина	24
Опытная	ТРП + внутрибрюшинное введение цианокобаламина	24
<i>II блок исследования (внутрипеченочное введение препаратов)</i>		
1 контрольная	ТРП + внутрипеченочное введение 0,9% раствор NaCl	24
2 контрольная	ТРП + внутрипеченочное введение адеметионина	24
Опытная	ТРП + внутрипеченочное введение цианокобаламина	24
<i>III блок исследования (комбинированное введение препаратов)</i>		
1 контрольная	ТРП + внутрибрюшинное введение адеметионина и цианокобаламина	24
Опытная	ТРП + внутрипеченочное введение цианокобаламина + внутрибрюшинное введение адеметионина	24

В I блоке изучали влияние на пострезекционную регенерацию печени внутрибрюшинного введения цианокобаламина и адеметионина, во II блоке – внутрипеченочного, в III блоке – комбинированного.

В I блоке исследования изучали влияние внутрибрюшинного введения адеметионина и цианокобаламина на пострезекционную регенерацию

печени. В 1-й контрольной группе стимуляцию пролиферации гепатоцитов не осуществляли; во 2-й контрольной – после резекции печени вводили адеметионин (конц. 400 мг/мл) внутривнутрибрюшинно в объеме 1 мл; в опытной – цианокобаламин 1 мл (конц. 500 мкг/мл).

Во II блоке исследования изучали влияние внутривнутрипеченочного введения препаратов на пострезекционную регенерацию печени. В 1-й контрольной группе в сохраненные доли печени интраоперационно внутривнутрипеченочно в объеме 1 мл вводили 0,9% раствор NaCl; во 2-й контрольной – раствор адеметионина (конц. 400 мг/мл); в опытной – раствор цианокобаламина (конц. 500 мкг/мл).

В III блоке исследования изучали комбинированное применение адеметионина и цианокобаламина и их влияние на пострезекционную регенерацию печени. В контрольной группе адеметионин (0,5 мл) и цианокобаламин (0,5 мл) вводили внутривнутрибрюшинно, в опытной – внутривнутрипеченочное введение цианокобаламина (0,5 мл) дополняли внутривнутрибрюшинным введением адеметионина (0,5 мл).

На 1, 5, 7 и 14-е сутки после операции осуществляли забор крови и биологического материала для гистологического и иммуногистохимического исследований, затем животных выводили из эксперимента.

2.3. Методика резекции печени

Во всех группах осуществляли типичную резекцию ~70% объема печени, согласно модели, предложенной G. Higgins и R. Anderson [125] (рисунок 2). Операцию выполняли под внутримышечным наркозом с использованием препарата «Золетил-100» в дозе 8 мкг/кг в асептических условиях.

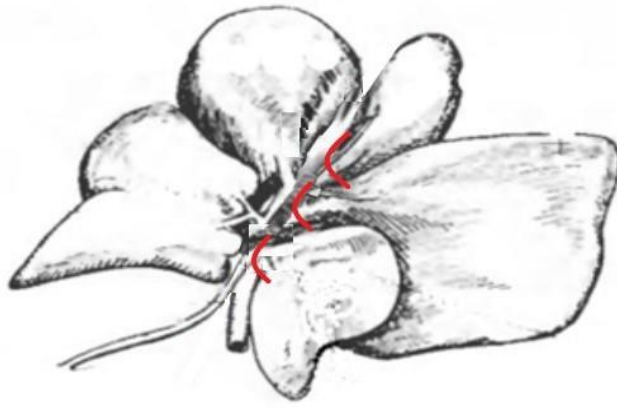


Рисунок 2 – Схема типичной резекции ~70% объема печени, согласно модели, предложенной G. Higgins и R. Anderson

В качестве хирургического доступа использовали верхнюю срединную лапаротомию (рисунок 3).



Рисунок 3 – Оперативный доступ (верхняя срединная лапаротомия)



Рисунок 4 – Выделение венозной связки, мобилизация удаляемой доли

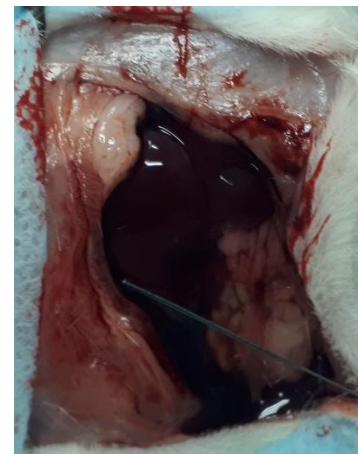


Рисунок 5 - Вид после резекции доли печени, контроль наложенной лигатуры

Мобилизацию удаляемых долей - двух левых и медиальной, осуществляли пересечением венозной связки. Мобилизованную долю печени выводили в рану (рисунок 4), обеспечивая визуализацию сосудистой ножки. Проксимальный участок выделенной сосудистой ножки перевязывали прошивной лигатурой, дистальный участок перевязывали. Две левые и медиальную доли печени отсекали выше уровня наложенной лигатуры

(рисунок 5). Осуществляли контроль гемостаза. Операционную рану ушивали послойно: мышцы – простым обвивным швом, кожу – узловыми. В качестве шовного материала на всех этапах использовалась полигидроксиацетиловая нить 4/0.

2.4. Устройство для инъекционного введения лекарственных препаратов

Устройство (патент 213859 U1 от 30.09.2022) состоит из силового механизма, содержащего пружину и поршень со штоком, размещенных в полости корпуса; емкости для лекарственного препарата, соединенной с подпоршневой полостью, являющейся частью полости корпуса, ограниченной поршнем; впускного и выпускного обратных клапанов, установленных в корпусе на входе для подачи препарата и на выходе из корпуса, и регулятора выдавливаемого объема препарата. Устройство имеет блок управления и индикации температуры; датчик температуры, соединенный с блоком управления и индикации температуры; нажимную рукоятку, соединенную со штоком; рукоятку, закрепленную на корпусе. Емкость для лекарственного препарата снабжена нагревательным элементом, подключенным к блоку управления, и каналом подвода воздуха. В торце корпуса размещен регулятор вводимого объема, который выполнен в виде упора. Также устройство имеет ручку для регулировки жесткости пружины с целью контроля скорости введения препарата. У наконечника устройства, а также в каждой насадке установлены датчики давления препарата (рисунок 6,7).

Устройство применяется совместно со сменными насадками. Насадка для инъекций состоит из корпуса, канюль для крепления игл и инъекционных игл. При проведении внутривенных инъекций использовали насадку для выполнения внутривенных инъекций с 9 иглами «G28», длиной 10 мм.

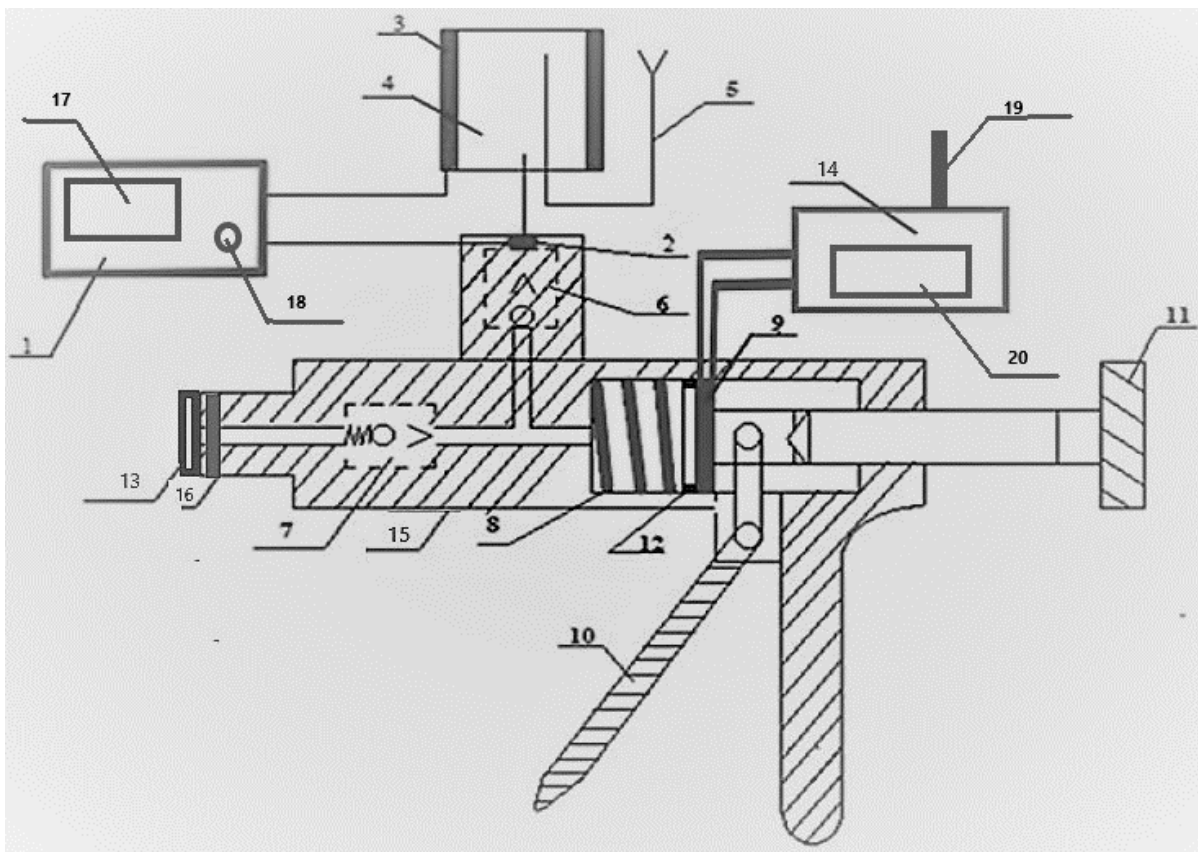


Рисунок 6 – Схема устройства для инъекционного введения лекарственных препаратов

1. Блок управления и индикации температуры. 2. Датчик температуры препарата. 3. Нагревательный элемент. 4. Емкость для препарата. 5. Канал подвода воздуха. 6. Впускной обратный клапан. 7. Выпускной обратный клапан. 8. Возвратная пружина. 9. Поршень. 10. Пусковая рукоятка. 11. Регулировочная рукоятка. 12. Уплотнительное кольцо. 13. Наконечник для крепления насадок. 14. Блок контроля давления препарата в устройстве. 15. корпус устройства. 16. Индикатор давления препарата у наконечника. 17. Монитор для контроля температуры. 18. Кнопка включения и выключения нагревательного элемента. 19. Ручка для регулировки жесткости пружины. 20. Монитор для контроля давления.



Рисунок 7 – Внешний вид устройства для инъекционного введения лекарственных препаратов с насадкой (патент RU 213859 U1 от 30.09.2022)

2.5. Лекарственный препарат «Цианокобаламин»

Цианокобаламин представляет собой раствор для инъекций в концентрации 500 мкг/мл и относится к группе водорастворимых витаминов. Обладает высокой биологической активностью, участвует в процессах трансметилирования, переносе водорода, образовании метионина, нуклеиновых кислот, холина и креатина. Основными функциями цианокобаламина при пострезекционной регенерации печени является участие в декомпактизации примембранного хроматина гепатоцитов. Активная форма цианокобаламина – метилкобаламин участвует в процессах метилирования, начальным этапом которого является реакция реметилирования гомоцистеина в метионин. Получающийся из гомоцистеина метионин преобразуется в S-аденозилметионин (SAM), основную молекулу-источник метильной группы для реакций метилирования ДНК.

Раствор цианокобаламина разрешен для подкожного, внутримышечного, внутривенного и интралюмбального введений. Режим дозирования устанавливают индивидуально, в зависимости от показаний, клинической ситуации и возраста.

2.6. Лекарственный препарат «Адеметионин»

Адеметионин представляет собой раствор для инъекций в концентрации 400 мг/мл, оказывает холеретическое и холекинетическое действия, обладает детоксикационными, регенерирующими, антиоксидантными, антифиброзирующими и нейропротекторными свойствами. Участвует в биологических реакциях трансметилирования и транссульфирования. Трансметилирование отвечает за метилирование мембранных фосфолипидов, реакцию, которая восстанавливает текучесть мембран и, следовательно, обеспечивает нормальную и правильную роль гепатоцитов. Путь транссульфирования приводит к синтезу таких соединений, как глутатион и таурин, которые участвуют в процессах детоксикации. В реакциях транссульфирования как предшественник цистеина, таурина, глутатиона (обеспечивает окислительно-восстановительный механизм клеточной детоксикации), коэнзима ацетилирования.

Раствор адеметионина рекомендован для внутримышечного или внутривенного введений. Способ применения, режим дозирования и длительность лечения устанавливают индивидуально, в зависимости от тяжести и течения заболевания.

2.7. Интраоперационное внутрибрюшинное введение цианокобаламина и адеметионина (I блок исследования)

Внутрибрюшинное введение цианокобаламина осуществляли после резекции двух левых и медиальной долей печени. В лапаротомную рану вводили ранорасширитель, что позволяло визуализировать оставшиеся доли печени, органы брюшной полости и поверхность брюшины. С помощью устройства для инъекционного введения лекарственных препаратов (патент 213859 U1) выполняли орошение брюшной полости раствором цианокобаламина в концентрации 500 мкг/мл общим объемом 1 мл таким образом, чтобы раствор распределялся по брюшине относительно

равномерно, при этом избегали нанесения раствора на оставшиеся доли печени. Внутривнутрибрюшинное введение адеметионина (конц. 400 мг/мл) в объеме 1 мл выполняли аналогичным образом.

2.8. Интраоперационное внутривнутрипеченочное введение цианокобаламина и адеметионина (II блок исследования)

Внутрипеченочное введение цианокобаламина выполняли согласно разработанному способу стимуляции пострезекционной пролиферации гепатоцитов (патент RU 2720451), с помощью устройства для инъекционного введения лекарственных препаратов (патент RU 213859 U1), таким же образом выполняли внутривнутрипеченочное введение адеметионина (патент RU 2023129221 A).

После резекции двух левых и медиальной долей печени в операционную рану вводили ранорасширитель, что позволяло визуализировать поверхность оставшихся долей печени. В паренхиме правых долей печени производили 9 инъекций цианокобаламина в концентрации 500 мкг/мл общим объемом 1 мл. Глубина введения игл составляла 2-3 мм, что обеспечивало минимальную травматизацию печеночной ткани, предупреждало повреждение сосудов, однако не вызывало отслоение капсулы печени. Расстояние между иглами было стандартизировано и составило 5 мм, что позволило обеспечить равномерное распределение препарата в ткани печени.

2.9. Способ интраоперационного комбинированного введения цианокобаламина и адеметионина (III блок исследования)

После резекции двух левых и медиальной долей печени в операционную рану вводили ранорасширитель, что позволяло визуализировать поверхность оставшихся долей печени. С помощью устройства для инъекционного введения лекарственных препаратов (патент 213859 U1) в паренхиме печени производили 9 инъекций цианокобаламина в концентрации 500 мкг/мл общим объемом 0,5 мл. Глубина введения игл

составляла 2-3 мм, расстояние между иглами было стандартизировано и составляло 5 мм. После этого, путем приподнимания ранорасширителя, обеспечивали достаточную визуализацию органов брюшной полости, поверхности брюшины и выполняли орошение брюшной полости раствором адеметионина в объеме 0,5 мл.

2.10. Методы исследования

Для оценки репаративных процессов применяли объективные, лабораторные, морфологические и статистические методы исследования.

2.10.1. Объективные методы исследования

Объективные методы включали в себя оценку общего состояния животных, оценку динамики изменения массы печени.

Оценка общего состояния животных выполнена на основании шкалы, предложенной В.А. Липатовым и соавт., 2012 [35], которая включала в себя следующие критерии: реакцию на внешние раздражители, рефлекс, дыхание, пищевое поведение, активность (таблица 2).

Таблица 2 - Шкала оценки состояния животных, предложенная В.А. Липатовым и соавт., 2012 [35]

Показатели	Баллы
Реакция на внешние раздражители и рефлекс отсутствуют, дыхание редкое, аритмичное.	1
Реакция на раздражители отсутствует, рефлекс угнетен, дыхание частое, поверхностное.	2
Реакция на сильные внешние раздражители, животное заторможено. Не пьет, пищи не принимает.	3
Адекватно реагирует на внешние раздражители, пьет воду, пищу не принимает, животное вялое, передвигается по клетке с неохотой.	4
Поведение животного не отличается от поведения здорового (интактного животного): активно передвигается по клетке, пьет и принимает пищу.	5

Оценка динамики восстановления массы печени после резекции была выполнена по формуле: $M_{исх} = M_{рез} * 3/2$, где $M_{исх}$ – исходная масса печени, $M_{рез}$ – масса резецированных долей печени.

2.10.2. Лабораторные методы исследования

2.10.2.1. Биохимический анализ

Биохимические методы исследования включали в себя оценку синдромов цитолиза (аспартатаминотрансфераза /АСТ/, аланинаминотрансфераза /АЛТ/), холестаза (билирубин общий /БЛ/, щелочная фосфатаза /ЩФ/, гаммаглутамилтранспептидаза /ГГТП/, общий холестерин /ОХ/), печеночной недостаточности (общий белок /ОБ/, глюкоза /ГЛ/, креатинин /КР/, мочевины /МЧ/), анализ липидного профиля (триглицериды /ТГ/, липопротеины высокой /ЛПВП/, низкой /ЛПНП/ и очень низкой плотности /ЛПОНП/, коэффициент атерогенности /КАГ/).

Полученные данные при анализе биохимического исследования крови сравнивали с нормальными показателями (таблица 3).

Таблица 3 – Нормы биохимических показателей у экспериментальных животных

Показатель, единицы измерения	Значения*
АЛТ, Ед/л	63±1
АСТ, Ед/л	45±3
ГГТП, Ед/л	7,5±0,5
ЩФ, Ед/л	138±4
Глюкоза, ммоль/л	8,8±0,4
Общий белок, г/л	>68
Общий билирубин, мкмоль/л	0,9±0,02
Креатинин, мкмоль/л	35±3
Мочевина, ммоль/л	7,3±0,3
Общий холестерин, ммоль/л	1,9± 0,08
Триглицериды, ммоль/л	0,9±0,06
ЛПВП, ммоль/л	1,16 ± 0,06
ЛПНП, ммоль/л = Общий ХС – (ХС-ЛПВП + ТГ/2,2)	0,37 ± 0,03
ЛПОНП = ТГ/2,2	0,17 ± 0,02
Коэффициент атерогенности = (общий холестерин – холестерин ЛПНП)/холестерин ЛПВП.	0,89 ± 0,02

Примечания: * – значения показателей у интактных животных по данным НИИ ЭБМ ФГБОУ ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России

Биохимический анализ проводили на биохимическом фотометрическом кинетическом анализаторе АБхФк-02 «НПП-ТМ» (ООО НПП «Техномедика», Россия) с помощью готовых коммерческих наборов согласно инструкции производителя. Определение активности аланинаминотрансферазы осуществляли кинетическим методом с использованием IFCC, fluid stable (производитель «Витал Диагностикс», Россия, каталожный номер В 01.15). Определение активности аспартатаминотрансферазы выполняли кинетическим методом с использованием IFCC, fluid stable (производитель «Витал Диагностикс», Россия, каталожный номер В 02.15). Определение активности гаммаглутамилтрансферазы осуществляли кинетическим методом (производитель «Витал Диагностикс», Россия, каталожный номер В 07.04). Определение глюкозы выполняли энзиматическим колориметрическим методом, с использованием Fluid Stable (производитель «Витал Диагностикс», Россия, каталожный номер В 05.01). Определение содержания креатинина осуществляли кинетическим методом в сыворотке крови и моче (реакция Яффе без депротенинизации, колориметрический, кинетика по двум точкам). Определение концентрации мочевины выполняли кинетическим уреазным/глутаматдегидрогеназным методом, с использованием Fluid Stable (производитель «Витал Диагностикс», Россия, каталожный номер В 08.04). Оценку концентрации общего белка осуществляли биуретовым методом (производитель реактивов «Витал Диагностикс», Россия, каталожный номер В 06.01). Определение концентрации общего билирубина выполняли методом Йендрассика-Грофа (производитель «Витал Диагностикс», Россия, каталожный номер В 03.12). Определение активности щелочной фосфатазы выполняли кинетическим методом (реактивы - нитрофенилфосфат, АМП-буфер, производитель «Витал Диагностикс», Россия, каталожный номер В 09.03). Оценку концентрации триглицеридов осуществляли энзиматическим колориметрическим методом (производитель «Витал Диагностикс», Россия,

каталожный номер В 17.02). Определение концентрации холестерина выполняли энзиматическим колориметрическим методом, с использованием Fluid Stable (производитель «Витал Диагностикс», Россия, каталожный номер В 13.11). Оценку концентрации липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) осуществляли энзиматическим методом с селективной защитой, без осаждения (производитель «Витал Диагностикс», Россия, каталожный номер В 13.06). Определение концентрации липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) осуществляли общепринятым расчетным способом: $ЛПВП = X - (ЛПНП + TG / 2,22)$. Коэффициент атерогенности (КА) определяли по формуле: $КА = (X - ЛПВП) / ЛПВП$.

В работе использовали калибраторы и стандарты для клинической лабораторной диагностики, сыворотки контрольную и стандартную (Trucal U, Trulab N, Trulab P), производитель – компания «Diasys», Россия.

Для оценки оксидативного стресса определяли активность систем антиоксидантной защиты: ферментативной /глутатионпероксидаза (ГП), глутатионредуктаза (ГР), супероксиддисмутаза (СОД)/ и неферментативной /SH-группы (GSH)/; а также продуктов перекисного окисления липидов /малоновый диальдегид (МДА)/ и белков (2,4-динитрофенилгидразин-производные (ДНФГ-производные)).

Исследование параметров оксидативного стресса и цитокинов в сыворотке крови осуществляли на спектрофотометре «Multiskan Go» (Thermo Fisher Scientific, Финляндия). Для проведения иммуноферментного анализа использовали планшет-отмыватель Wellwash (Thermo Fisher Scientific, Финляндия) и термошейкер PST-60HL-4 (Biosan, Латвия). Сыворотку крови, полученную стандартным методом, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут на центрифуге LMC-3000 (Biosan, Латвия). Забор крови осуществляли в пробирки «Vacuette» с активатором свертывания крови («Greiner bio-one», Австрия).

2.10.2.2. Иммуноферментный анализ

Интерлейкин-1 β (IL-1 β) и трансформирующий ростовой фактор- β 1 (TGF- β 1) в сыворотке крови измеряли, соответственно, с помощью готовых коммерческих наборов Rat IL-1 β Platinum ELISA, компании Bender MedSystems GmbH, катал. № BMS630, лот 127006020 и Rat TGF-beta1 Platinum ELISA, компании Bender MedSystems GmbH, катал. № BMS623/3, лот 129690017, Австрия.

2.10.3. Морфологические методы исследования

Исследование включало в себя гистологический и иммуногистохимический анализы фрагментов ткани печени. Фиксация биоматериала проводилась в 10% нейтральном формалине. Пробоподготовка для морфологического анализа включала в себя классические протоколы гистологической техники с изготовлением парафиновых срезов толщиной 5 мкм для гистологического окрашивания и 2 мкм для иммуногистохимического анализа.

2.10.3.1. Гистологические исследования

Для изучения морфометрических параметров гепатоцитов и оценки соотношения двуядерных и одноядерных клеток проводили окраску гематоксилином и эозином. Общее количество анализируемых гепатоцитов у каждого животного составляло не менее 4500. Подсчет количества одноядерных и двуядерных гепатоцитов в ткани печени выполняли на единицу площади, которая во всех измерениях была стандартизирована (314,44 см³), что позволяло достичь достоверных результатов, а также рассчитывали их соотношение для каждого из анализируемых участков ткани печени, без учета зонального строения печеночных долек; полученный результат выражали в процентах.

Для оценки количества ретикулярных волокон в интраорганной соединительной ткани срезы печени импрегнировали серебром. Подсчет количества ретикулярных волокон осуществляли с помощью программы

ImageJ, рассчитывали общую площадь исследуемого фрагмента печеночной ткани и абсолютное содержание в ней ретикулярных волокон. Затем оценивали изменение количества ретикулярных волокон на разных сроках регенерации.

Для оценки количества коллагеновых волокон в интраорганной соединительной ткани срезы печени окрашивали по Массону-Голднеру. Оценку количества коллагеновых волокон осуществляли с помощью программы ImageJ, рассчитывали общую площадь исследуемого фрагмента печеночной ткани и процентное содержание в ней коллагеновых волокон. Также оценивали изменение стромальной структуры печени с учетом долькового строения на разных сроках регенерации.

2.10.3.2. Иммуногистохимические исследования

Оценку пролиферативной активности гепатоцитов осуществляли путем иммуногистохимической детекции с соблюдением необходимых процедур протокола 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, Германия). Индекс пролиферации подсчитывали путем определения Ki-67-положительных ядер в одноядерных и двоядерных 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.

Для оценки воспалительных изменений в печени проводили анализ количества тучных клеток (ТК). Подсчет выполняли на единицу площади, площадь во всех измерениях была стандартизирована ($314,44 \text{ см}^3$), что позволяло достичь достоверных результатов. Иммуногистохимическую детекцию тучных клеток проводили мышинными антителами (ab2378, разведение 1:2000) в течение 12 часов с последующим нанесением вторичных антител, конъюгированных с HRP (Goat anti-Mouse IgG H&L, #AS-M1-HRP) и реагента ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrat Kit (#SK-4105). В результате на микропрепаратах идентифицировались как ТК, содержащие триптазу, так и просто гранулы или фрагменты цитоплазмы с триптазой. Препараты изучали на микроскопе ZEISS Axio Imager. A2 с программным обеспечением ZEN 2.3 (Carl Zeiss, ФРГ). Оценка содержания уровня ТК, содержащих триптазу, проводилась планиметрическим анализом (на поле зрения, объектив x40). Для подсчетов использовали 30 полей зрения, изображения были документированы камерой AxioCam 506 color. В дальнейшем полученные числовые значения пересчитывались для получения количественных данных, отражающих плотность распределения ТК на мм^2 операционного материала.

2.10.4. Статистические методы исследования

Для статистической обработки данных был использован пакет программ STATGRAPHICS Centurion 18, версия 18.1.12 (Statgraphics Technologies, Inc., США).

Статистическая обработка полученных результатов проведена путем дисперсионного анализа. Сравнение дисперсий полученных выборок исследуемых объектов позволило оценить степень разброса данных в каждой группе, а также насколько сильно различаются показатели между двумя группами. В случаях, если дисперсия в одной группе исследуемых объектов

наблюдалась выше, чем в другой, это указывало на то, что в данной группе больше разнообразия или различных факторов, влияющих на результаты. Сравнение дисперсий позволило выявить, есть ли статистически значимые различия между группами, которые могут быть связаны с разными факторами риска, оперативным лечением или другими факторами.

В работе для сравнения средних значений по 8 различным группам использовался дисперсионный анализ (ANOVA), который позволял определить, есть ли статистически значимые различия между средними значениями групп и оценить, насколько велики эти различия.

Рассчитывались следующие три типа дисперсий: внутригрупповая (SSE), межгрупповая (SSB) и общая (SST).

Формула для общей дисперсии:

$SST = \sum(X_i - X)^2$, где X_i – значение переменной в i -ой группе, X – общее среднее значение переменной.

Формула для внутригрупповой дисперсии (SSE):

$SSE = \sum(X_{i,j} - X_j)^2$, где $X_{i,j}$ – значение переменной в i -ой группе и j -ом наблюдении, X_j – среднее значение переменной в j -ой группе.

Формула для межгрупповой дисперсии (SSB):

$SSB = \sum(X_j - X)^2$, где X_j – среднее значение переменной в j -ой группе, X – общее среднее значение переменной.

В качестве основного инструмента дисперсионного анализа применялся F-тест, который рассчитывался как отношение межгрупповой дисперсии к внутригрупповой дисперсии и показывал, насколько значимы различия между группами.

В результате расчета были получены следующие гипотезы: нулевая H_0 – различия в степени однородности показателей между группами статистически незначимы; гипотеза H_1 – различия в степени однородности показателей между группами статистически значимы.

Для определения статистической значимости различий между дисперсиями использовали таблицу распределения Фишера-Снедекора. Определяли значение критической F-статистики для выбранных уровней значимости ($p = 0,05$) и степеней свободы. Если значение F-теста было больше критического значения, то можно утверждать, что различия между группами статистически значимы. Значение p количественно определяло вероятность нулевой гипотезы. Если получали $p < 0,05$, то считали, что дисперсии различных исследуемых групп имеют статистически значимые различия.

Проверка нормальности распределения определялась с помощью критерия Шапиро-Уилка, а также через оценку эксцесса и асимметрии. При условии нормального распределения данных количественные величины были представлены в виде выборочного среднего \pm стандартного отклонения. При распределении переменной, отличном от нормального, данные представлялись в виде медианы и 95,0% доверительного интервала, или межквартильного размаха между 25 и 75 перцентилями.

ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНТРАОПЕРАЦИОННОГО ВНУТРИБРЮШИННОГО ВВЕДЕНИЯ ЦИАНОКОБАЛАМИНА И АДЕМЕТИОНИНА ПОСЛЕ РЕЗЕКЦИИ ПЕЧЕНИ (I БЛОК ИССЛЕДОВАНИЯ)

3.1. Результаты объективных методов исследования

Объективные методы включали в себя оценку общего состояния, расчет полученной массы печени при выведении животных из эксперимента.

Общее состояние животных во всех группах (n=72) в течение первых суток после операции соответствовало 3 баллам по шкале, предложенной В.А. Липатовым и соавт. [35]. Отмечалось отсутствие аппетита, животные не пили, реагировали только на сильные раздражители. На 5-е сутки после резекции печени нормализация общего состояния наблюдалась в 1-й контрольной группе (ТРП) у 55,56% (n=18) животных, во 2-й контрольной (ТРП + внутрибрюшинное введение адеметионина) – у 77,78% (n=18) животных, в опытной (ТРП + внутрибрюшинное введение цианокобаламина) – у 72,22% (n=18). К 7-м суткам эксперимента во 2-й контрольной (n=12) и опытной (n=12) группах отмечали нормализацию общего состояния у всех животных, в 1-й контрольной – у 91,67% (n=12) животных при оценке общего состояния получили 5 баллов. Во всех случаях (n=36) отмечали формирование послеоперационного рубца и заживление послеоперационной раны. К 14-м суткам после резекции печени общее состояние животных (n=18) не отличалось от интактных. В области послеоперационной раны во всех случаях отмечалось практически полное восстановление покрова шерсти.

При выведении животных из эксперимента и макроскопической оценке печени изменений не было выявлено: цвет, плотность и гладкость органа были идентичны во всех группах исследования.

На 1-е сутки после операции масса печени животных контрольных и опытной групп составила не более 34% от исходной*. На 5-е сутки после резекции в 1-й контрольной группе средняя масса печени была равна $8,65 \pm 1,53$ г, что составило 50,01% от ее исходной массы, во 2-й контрольной – $6,29 \pm 0,68$ г (50,52%); в 1-й опытной – $8,67 \pm 0,96$ г (48,35%). К 7-м суткам в 1-й контрольной группе отмечали восстановление до 69,59% от исходной массы печени, во 2-й контрольной – до 65,08%; в опытной – до 62,02%. На 14-е сутки после резекции масса печени в 1-й контрольной группе составила 75,65% от исходной, во 2-й контрольной – 81,80%, в опытной – 85,26% (таблица 4).

Таблица 4 – Динамика массы печени в основной и контрольной группах исследования, г

Сутки после резекции	Группа исследования		
	1 контрольная	2 контрольная	Опытная
1	$5,00 \pm 0,58$	$4,38 \pm 0,37$	$5,85 \pm 1,42$
5	$8,65 \pm 1,53^2$	$6,29 \pm 0,68^{1,2}$	$8,67 \pm 0,96^2$
7	$10,32 \pm 1,52^2$	$8,35 \pm 0,67^2$	$11,12 \pm 3,21^2$
14	$11,65 \pm 1,17^2$	$10,43 \pm 0,83^2$	$13,07 \pm 2,14^2$

Примечание: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-й контрольной группой ($p < 0,05$), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками ($p < 0,05$)

Таким образом, наиболее быстрая нормализация общего состояния наблюдалась во 2-й контрольной группе – у 77,8% животных на 5-е сутки после резекции печени, что превышало показатели 1-й контрольной группы на 27,8%, опытной – на 5,6%.

При оценке восстановления исходной массы печени к 14-м суткам наилучшие показатели наблюдались в опытной группе – 85,26%, что превышало показатели 1-й контрольной группы на 9,61%, 2-й контрольной – на 3,46%. Статистически значимых различий между группами при введении цианкобаламина и адеметионина выявлено не было.

* Расчет исходной массы печени выполнен по формуле (см. стр. 47)

3.2. Результаты лабораторных методов исследования (биохимических, иммуноферментных)

При выполнении лабораторных исследований проводили оценку синдромов цитолиза, холестаза, печеночно-клеточной недостаточности, окислительного стресса, а также оценивали экспрессию факторов роста.

При изучении динамики цитолитического синдрома были выявлены значительные отклонения показателей аспартатаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ) на 1-е сутки после операции – превышение их нормальных значений более чем на 30% (таблица 5).

Таблица 5 – Динамика показателей цитолитического синдрома (АСТ, АЛТ) в группах исследования, Ед/л

Группа исследования	Показатели цитолитического синдрома	
	АЛТ	АСТ
1 сутки		
1 контрольная	107,00±6,81	78,83±5,12
2 контрольная	90,67±4,13 ¹	72,17±2,40
Опытная	95,00±4,34 ¹	74,17±4,02
5 сутки		
1 контрольная	102,00±5,40	88,33±10,50
2 контрольная	88,83±3,19 ¹	68,17±2,23 ¹
Опытная	90,67±2,73 ¹	67,17±2,56 ^{1, 2}
7 сутки		
1 контрольная	78,50±5,50 ²	58,50±2,88 ²
2 контрольная	74,00±3,58 ²	55,17±2,32 ²
Опытная	69,33±1,75 ^{1, 2}	54,00±2,37 ²
14 сутки		
1 контрольная	64,50±4,04 ²	46,83±3,43 ²
2 контрольная	63,33±0,52 ²	46,00±2,45 ²
Опытная	66,00±2,76 ²	48,17±2,93 ²

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-й контрольной группой (p<0,05), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками (p<0,05)

На 5-м сутки после операции наблюдалось снижение показателей синдрома цитолиза во 2-й контрольной и опытной группах в сравнении с 1-й

контрольной. Значение АЛТ во 2-контрольной группе составило $88,83 \pm 3,19$ Ед/л, АСТ – $68,17 \pm 2,23$ Ед/л, в опытной – $90,67 \pm 2,73$ Ед/л и $67,17 \pm 2,56$ Ед/л, соответственно. На 7-е сутки после резекции печени нормализации показателей не наблюдалось. АЛТ в 1-й контрольной группе составил $78,50 \pm 5,50$ Ед/л, во 2-й контрольной – $74,00 \pm 3,58$ Ед/л, в опытной – $69,33 \pm 1,75$; АСТ в 1-й контрольной группе был равен $58,50 \pm 2,88$ Ед/л, во 2-й контрольной – $55,17 \pm 2,32$ Ед/л, в опытной – $54,00 \pm 2,37$ Ед/л. На 14-е сутки отмечали нормализацию изучаемых показателей в группах исследования, наилучшие показатели наблюдались во 2-й контрольной группе, где уровень АЛТ составил $63,33 \pm 0,52$ Ед/л, АСТ – $46,00 \pm 2,45$ Ед/л.

Таким образом, наибольшие отклонения АЛТ на 1-е сутки были зарегистрированы в 1-й контрольной группе, во 2-й контрольной – данный показатель был ниже на 15,26%, в опытной – на 11,21%. Различия по показателю АСТ были статистически недостоверны. На 5-е сутки во 2-й контрольной группе АЛТ был ниже на 12,91%, АСТ – на 22,82% в сравнении с 1-й контрольной группой, в опытной – на 11,11% и 23,96%, соответственно. На 7-е сутки сохранялась сходная динамика. К 14-м суткам отмечалась нормализация показателей у всех животных только во 2-й контрольной группе.

При оценке показателей холестатического синдрома на 1-е сутки после операции наблюдалось значительное повышение уровней общего билирубина (БЛ), щелочной фосфатазы (ЩФ) и гаммаглутамилтранспептидазы (ГГТП) у всех животных. Наибольшие значения БЛ отмечали во 2-й контрольной и опытной группах, ЩФ и ГГТП – в 1-й опытной группе. На 5-е сутки эксперимента изменения данных показателей были статистически недостоверны в сравнении с 1-ми сутками. К 7-м суткам после резекции печени уровень БЛ в 1-й контрольной группе составил $1,13 \pm 0,05$ мкмоль/л, во

2-й контрольной – выше на 7,96%. К 14-м суткам нормализацию данного показателя отмечали у 33,33% животных в опытной группе, в контрольных группах нормализации БЛ не наблюдалось (таблица 6).

Таблица 6 – Динамика показателей холестатического синдрома в группах исследования

Показатель / Группа	БЛ, мкмоль/л	ЩФ, ед/л	ГГТП, ед/л	ОХ, ммоль/л
1 сутки				
1 контрольная	1,33±0,06	204,83±16,77	12,83±1,47	1,45±0,19
2 контрольная	1,45±0,14	190,67±4,76	10,35±0,16 ¹	1,35±0,19
Опытная	1,45±0,14	190,67±4,76	10,30±0,21 ¹	1,33±0,16
5 сутки				
1 контрольная	1,33±0,04	185,67±5,01	11,50±1,52	1,38±0,19
2 контрольная	1,43±0,12	188,00±3,16	10,45±0,10	1,32±0,11
Опытная	1,43±0,12	188,00±3,16	10,42±0,12	1,27±0,12
7 сутки				
1 контрольная	1,13±0,05 ²	172,50±4,64 ²	9,68±0,39 ²	1,55±0,10
2 контрольная	1,22±0,12	169,17±4,49 ²	9,82±0,18 ²	1,40±0,14
Опытная	1,22±0,12	169,17±4,49 ²	9,82±0,18 ²	1,40±0,14
14 сутки				
1 контрольная	1,04±0,02 ²	152,83±4,26 ²	8,40±0,35 ²	1,65±0,08 ²
2 контрольная	1,07±0,10 ²	151,50±6,53 ²	8,30±0,74 ²	1,78±0,12 ²
Опытная	1,03±0,12 ²	151,50±6,53 ²	8,85±0,23 ²	1,70±0,09 ²

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-й контрольной группой (p<0,05), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками (p<0,05)

При оценке ЩФ на 7-е сутки после резекции печени отмечали снижение данного показателя на 15,78% в 1-й контрольной группе и на 11,28% во 2-й контрольной и опытной группах, в сравнении с 1-ми сутками. К 14-м суткам нормализации данного показателя и статистически значимых различий между группами не отмечали.

При оценке уровня ГГТП на 7-е сутки данный показатель составил в 1-й контрольной группе – 9,68±0,39 Ед /л, во 2-й контрольной и опытной группах – выше на 1,45%. На 14-е сутки исследования отмечали снижение ГГТП во

всех группах. В 1-й контрольной группе данный показатель составил $8,40 \pm 0,35$ Ед /л, во 2-й контрольной – ниже на 1,19%, в опытной – выше на 5,36%, однако различия между группами были статистически недостоверны.

Показатели ОХ в течение 14 суток после операции были значительно ниже нормальных значений, отмечалось повышение данного показателя в динамике с первых по 14-е сутки. На 14-е сутки после резекции печени наилучшие показатели ОХ отмечали во 2-й контрольной группе – $1,78 \pm 0,12$ ммоль/л, в 1-й контрольной – ниже на 7,87%, в опытной – на 4,71% (таблица 6).

Таким образом, максимальные показатели холестатического синдрома были зарегистрированы на 1-е сутки после резекции печени: ЩФ, ГГТП и ОХ – в 1-й контрольной группе, БЛ – во 2-й контрольной и опытной группах. На 5-е и 7-е сутки статистически значимых различий между группами выявлено не было. На 14-е сутки после операции наблюдалась нормализация БЛ только в опытной группе, ГГТП и ОХ – только во 2-й контрольной группе. Нормализации ЩФ в группах исследования зарегистрировано не было.

При оценке показателей синдрома печеночно-клеточной недостаточности наблюдалось значительное снижение белково-синтетической функции печени у всех животных, что подтверждалось показателями общего белка (ОБ). На 1-е сутки после резекции печени уровень ОБ в 1-й контрольной группе составил $39,00 \pm 2,09$ г/л, во 2-й контрольной и опытной – $44,33 \pm 3,67$ г/л. На 5-е сутки данный показатель повышался, однако статистически значимых различий в сравнении с 1-ми сутками отмечено не было. На 7-е сутки уровень ОБ в 1-й контрольной группе составил $44,33 \pm 2,25$ г/л, во 2-й контрольной – $52,33 \pm 2,16$ г/л, в опытной – $52,00 \pm 2,53$ г/л. К 14-м суткам после резекции наблюдали повышение ОБ во всех группах, наибольшее значение отмечали во 2-й контрольной группе – $59,33 \pm 4,03$ г/л, однако нормализации данного показателя зарегистрировано не было. После резекции печени наблюдали нарушение

углеводного и азотистого обменов, что подтверждалось отклонениями показателей ГЛ, КР и МЧ. Глюкоза крови была повышена с первых по 14-е сутки эксперимента у всех животных (таблица 7).

Таблица 7 – Динамика глюкозы крови в группах исследования, ммоль/л

Сутки после операции	Группа		
	1 контрольная	2 контрольная	Опытная
1	10,67±0,73	10,68±0,26	10,75±0,34
5	10,75±0,63	11,15±0,25	11,22±0,35
7	10,47±0,83	10,32±0,29	10,38±0,30
14	9,72±0,80	9,60±0,19 ¹	9,70±0,20

Примечание: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками (p<0,05)

При оценке показателей азотистого обмена отмечали повышение МЧ и КР у всех животных на 1-е сутки после резекции печени. МЧ в 1-й контрольной группе составила 7,54±0,20 ммоль/л, КР - 41,50±2,43 мкмоль/л, во 2-й контрольной МЧ – 8,18±0,19 ммоль/л, КР – 49,00±5,06 мкмоль/л, в опытной – 8,10±0,18 ммоль/л и 49,01±5,06 мкмоль/л, соответственно. На 5-е сутки статистически значимых различий по данным показателям в сравнении с 1-ми сутками выявлено не было. К 7-м суткам МЧ в 1-й контрольной группе составила 8,30±0,28 ммоль/л, во 2-й контрольной – 8,30±0,20 ммоль/л, в опытной – 8,25±0,16 ммоль/л; КР в 1-й опытной – 43,33±3,61 мкмоль/л, во 2-й контрольной – 40,17±1,17 мкмоль/л, в опытной – 40,16±1,17 мкмоль/л. К 14-м суткам наблюдалось значительное снижение данных показателей в сравнении с 1-ми сутками. Нормализация КР зарегистрирована во всех группах животных, МЧ – только в опытной группе.

Таким образом, при оценке показателей синдрома печеночно-клеточной недостаточности наблюдалось значительное снижение белково-синтетической функции печени, нарушение углеводного и азотистого обменов у всех животных. Общий белок был значительно снижен во всех группах и нормализации данного показателя к 14-м суткам не отмечали, наилучший показатель был зарегистрирован во 2-й контрольной группе – на 12,75% ниже

нормы. У всех животных с первых по 14-е сутки наблюдалось повышение уровня глюкозы крови, нормализации данного показателя зарегистрировано не было, наименьшее его значение отмечали также во 2-й контрольной группе. При оценке показателей азотистого обмена нормализация уровня креатинина была зарегистрирована на 14-е сутки эксперимента у всех животных, уровень мочевины в крови возвращался к норме только в опытной группе.

При анализе липидного профиля на 1-е сутки после операции были отмечены следующие результаты (таблица 8).

Таблица 8 – Динамика показателей липидного профиля в группах исследования

Группа исследования	Показатель липидного профиля				
	ТГ, ммоль/л	ЛПВП, ммоль/л	ЛПНП, ммоль/л	ЛПОНП, ммоль/л	КАГ
1 сутки					
1 контрольная	0,032 ±0,004	0,067 ±0,021	1,369 ±0,181	0,014 ±0,002	1,238 ±0,084
2 контрольная	0,032 ±0,004	0,067 ±0,022	1,269 ±0,195	0,014 ±0,002	1,238 ±0,084
Опытная	0,032 ±0,004	0,045 ±0,010 ¹	1,274 ±0,169	0,014 ±0,002	1,343 ±0,136
5 сутки					
1 контрольная	0,045 ±0,005 ²	0,082 ±0,008	1,281 ±0,191	0,020 ±0,002 ²	1,252 ±0,038
2 контрольная	0,045 ±0,005 ²	0,082 ±0,008	1,215 ±0,092	0,020 ±0,002 ²	1,252 ±0,038
Опытная	0,045 ±0,005 ²	0,070 ±0,009 ²	1,176 ±0,120	0,020 ±0,002 ²	1,299 ±0,071
7 сутки					
1 контрольная	0,047 ±0,008 ²	0,127 ±0,064	1,402 ±0,062	0,021 ±0,004 ²	1,208 ±0,103
2 контрольная	0,047 ±0,008 ²	0,127 ±0,064	1,252 ±0,170	0,021 ±0,004 ²	1,208 ±0,103
Опытная	0,047 ±0,008 ²	0,152 ±0,120	1,227 ±0,139	0,021 ±0,004 ²	1,439 ±0,681
14 сутки					
1 контрольная	0,058 ±0,022 ²	0,283 ±0,117 ²	1,340 ±0,156	0,027 ±0,010 ²	1,107 ±0,061

Продолжение таблицы 8

2 контрольная	0,060 ±0,024 ²	0,250 ±0,105 ²	1,506 ±0,193	0,027 ±0,011	1,127 ±0,072
Опытная	0,058 ±0,022 ²	0,300 ±0,089 ²	1,373 ±0,176	0,027 ±0,010 ²	1,099 ±0,059

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-й контрольной группой ($p < 0,05$), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками ($p < 0,05$)

Статистически значимые различия наблюдались только при оценке ЛПВП: в опытной группе – $0,045 \pm 0,010$ ммоль/л, в сравнении с 1-й контрольной группой – $0,067 \pm 0,021$ ммоль/л. На 5-е и 7-е сутки достоверных различий между группами не наблюдалось.

К 14-м суткам после резекции печени отмечали нормализацию показателей липидного профиля в группах исследования. Была отмечена сходная тенденция у всех животных – снижение ТГ, ЛПВП и повышение ЛПНП, ЛПОНП и КАГ.

Таким образом, при оценке липидного профиля можно отметить нарушение жирового обмена с первых по 7-е сутки после резекции печени, при этом статистически значимые различия наблюдались только на 1-е сутки при сравнении опытной и 1-й контрольной групп. К 14-м суткам эксперимента показатели нормализовались у всех животных.

Для оценки оксидативного стресса проводили определение активности систем антиоксидантной защиты: ферментативной /ГП, ГР, СОД/ и неферментативной /GSH/ (таблица 9), а также продуктов перекисного окисления липидов и белков /МДА, ДНФГ-производные/. В группах исследования наблюдалась сходная динамика показателей – повышение активности систем антиоксидантной защиты на 5-е и 7-е сутки исследования. Наибольшая активность ферментативной системы защиты была отмечена во 2-й контрольной группе: на 5-е сутки – ГП – $0,193 \pm 0,008$ Е/мл, ГР – $0,033 \pm 0,003$ Е/мл, на 7-е сутки СОД – $0,469 \pm 0,055$ Ед/мл. Максимальная

активность неферментативной системы так же была зарегистрирована во 2-й контрольной группе: на 7-е сутки после резекции печени GSH составили $99,068 \pm 6,533$ мг%. На 5-е сутки статистически значимых различий между группами не отмечали, на 7-е сутки различия между 1-й и 2-й контрольными группами были достоверны только при оценке ГР, на 14-е сутки – при оценке ГП и СОД.

Таблица 9 – Динамика показателей системы антиоксидантной защиты в группах исследования

Группа исследования	Показатели системы антиоксидантной защиты			
	ГП, Е/мл	ГР, Е/мл	СОД, Ед /мл	GSH, мг%
1 сутки				
1 контрольная	$0,188 \pm 0,014$	$0,021 \pm 0,001$	$0,380 \pm 0,074$	$87,797 \pm 7,329$
2 контрольная	$0,167 \pm 0,011$	$0,015 \pm 0,002^1$	$0,388 \pm 0,034$	$84,045 \pm 3,414$
Опытная	$0,160 \pm 0,016$	$0,013 \pm 0,003^1$	$0,381 \pm 0,044$	$85,720 \pm 5,708$
5 сутки				
1 контрольная	$0,191 \pm 0,024$	$0,028 \pm 0,004^2$	$0,412 \pm 0,048$	$85,958 \pm 5,983$
2 контрольная	$0,193 \pm 0,008^2$	$0,033 \pm 0,003^2$	$0,420 \pm 0,031$	$83,287 \pm 2,666$
Опытная	$0,189 \pm 0,011$	$0,030 \pm 0,006^2$	$0,410 \pm 0,037$	$83,075 \pm 2,953$
7 сутки				
1 контрольная	$0,184 \pm 0,016$	$0,019 \pm 0,001$	$0,430 \pm 0,063$	$93,453 \pm 9,612$
2 контрольная	$0,176 \pm 0,008$	$0,025 \pm 0,002^{1,2}$	$0,469 \pm 0,055$	$99,068 \pm 6,533^2$
Опытная	$0,167 \pm 0,014$	$0,020 \pm 0,003^2$	$0,424 \pm 0,050$	$89,720 \pm 2,499$
14 сутки				
1 контрольная	$0,142 \pm 0,014^2$	$0,014 \pm 0,003$	$0,331 \pm 0,035$	$77,468 \pm 5,726$
2 контрольная	$0,171 \pm 0,010^1$	$0,014 \pm 0,002$	$0,457 \pm 0,032^{1,2}$	$77,872 \pm 6,554$
Опытная	$0,157 \pm 0,008$	$0,011 \pm 0,003$	$0,335 \pm 0,014$	$75,401 \pm 4,506$

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-й контрольной группой ($p < 0,05$), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками ($p < 0,05$)

При оценке динамики МДА отмечалось повышение данного показателя во всех группах исследования, что было обосновано активностью систем антиоксидантной защиты. Наибольший показатель на 1-е сутки после резекции печени был зарегистрирован в 1-й контрольной группе – $23,3 \pm 5,0$ нмоль/л, во 2-й контрольной ниже на 7,45%, в опытной – на 6,72%. Во 2-й контрольной и опытной группах наибольшие значения наблюдались на 5-е и

7-е сутки эксперимента; во 2-й контрольной на 5-е сутки – $22,3 \pm 2,9$ нмоль/л, на 7-е – $19,5 \pm 2,5$ нмоль/л, в опытной – $21,3 \pm 1,8$ нмоль/л и $21,5 \pm 3,4$ нмоль/л, соответственно. К 14-м суткам показатель МДА снижался во всех группах исследования, однако статистически значимых различий между группами отмечено не было (таблица 10).

Одним из показателей накопления продуктов окисления являлась динамика ДНФГ в крови животных. На 1, 5 и 14-е сутки статистически значимых различий между контрольными и опытной группами выявлено не было. Значимые различия по данному показателю были отмечены на 7-е сутки после резекции печени, ДНФГ в 1-й контрольной группе составил $2,6 \pm 0,1$ Ед/г белка, во 2-й контрольной и опытной - $2,3 \pm 0,1$ Ед/г белка (таблица 10).

Таблица 10 – Динамика показателей перекисного окисления липидов в группах исследования

Сутки после резекции	Группа исследования		
	1 контрольная	2 контрольная	Опытная
МДА, нмоль/л			
1	$23,23 \pm 5,03$	$21,50 \pm 2,35$	$21,67 \pm 2,93$
5	$15,69 \pm 1,49^2$	$22,27 \pm 2,89^1$	$21,34 \pm 1,81^1$
7	$19,11 \pm 3,17$	$19,11 \pm 3,17$	$21,51 \pm 3,41$
14	$14,02 \pm 1,90^2$	$15,03 \pm 2,91^2$	$17,37 \pm 1,97^2$
ДНФГ, Ед/г белка			
1	$2,19 \pm 0,14$	$2,39 \pm 0,07^1$	$2,35 \pm 0,10$
5	$2,30 \pm 0,12$	$2,22 \pm 0,06^2$	$2,37 \pm 0,14$
7	$2,59 \pm 0,12^2$	$2,25 \pm 0,07^{1,2}$	$2,33 \pm 0,13^1$
14	$2,27 \pm 0,10$	$2,22 \pm 0,07^2$	$2,29 \pm 0,09$

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-й контрольной группой ($p < 0,05$), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками ($p < 0,05$)

Таким образом, при оценке активности систем антиоксидантной защиты и динамики продуктов окисления наибольшая активность ферментативной системы защиты отмечалась на 5-е и 7-е сутки после резекции печени, максимальные показатели – во 2-й контрольной группе, при

этом наблюдали статистически значимое снижение ДНФГ во 2-й контрольной группе на 7-е сутки в сравнении с 1-й контрольной группой.

При оценке экспрессии первичных и вторичных митогенов в ткани печени отмечали повышение концентрации IL-1 β и TGF- β 1 на 5-е и 7-е сутки после резекции печени у всех животных (таблица 11).

Таблица 11 – Динамика экспрессии факторов роста в группах исследования, пг/мл

Показатель	Группа исследования		
	1 контрольная	2 контрольная	Опытная
1 сутки			
IL-1 β	33,10 [20,67;40,33]	36,96 [30,21;43,15]	35,30 [30,15;42,15]
TGF- β 1	2242,52 [1871;2847]	1902,67 [1324;2211]	1909,69 [1245;2245]
5 сутки			
IL-1 β	39,70 [30,12;48,22]	47,87 [41,23;56,32]	49,27 ² [41,24;55,21]
TGF- β 1	2856,00 [2480;3157]	2826,67 ² [2451;3145]	2840,17 ² [2541;3120]
7 сутки			
IL-1 β	26,18 ² [20,48;31,22]	36,56 ¹ [30,25;45,63]	36,42 ¹ [29,89;47,16]
TGF- β 1	2991,27 [2467;3694]	2997,00 ² [2458;3641]	3015,50 ² [2451;3741]
14 сутки			
IL-1 β	15,84 ² [10,12;19]	24,05 ² [20,14;33,12]	25,04 ^{1,2} [20,16;32,14]
TGF- β 1	1219,48 ² [1116;1362]	1272,33 [1120;1452]	1311,67 [1107;1745]

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-й контрольной группой (p<0,05), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками (p<0,05)

На 1-е сутки статистически значимых различий в группах исследования не отмечали. На 5-е сутки во всех группах зарегистрировано максимальное значение IL-1 β : в 1-й контрольной – 39,70 [30,12; 48,22] пг/мл, во 2-й контрольной – выше на 20,56%, в опытной – на 24,11%. На 7-е сутки

отмечали максимальное значение TGF- β 1: в 1-й контрольной – 2991,27 [2467; 3694] пг/мл, во 2-й контрольной – выше на 0,2%, в опытной – выше на 0,8%. К 14-м суткам отмечалось снижение IL-1 β и TGF- β 1 у всех животных, статистически значимых различий между группами выявлено не было.

При оценке динамики факторов роста максимальные показатели IL-1 β наблюдались на 5-е сутки после резекции печени в опытной группе. Наибольшее значение TGF- β 1 было зарегистрировано на 7-е сутки в опытной группе, однако статистически значимых различий по данному показателю между группами в указанный срок отмечено не было.

Таким образом, при оценке результатов лабораторных методов исследования наименьшие значения показателей синдромов цитолиза и холестаза наблюдались во 2-й контрольной группе, так же в данной группе было зарегистрировано частичное восстановление белково-синтетической функции печени и снижение окислительного стресса. В опытной группе отмечали нормализацию азотистого обмена и повышение экспрессии IL-1 β и TGF- β 1. Восстановление жирового обмена зарегистрирована во всех группах исследования к 14-м суткам после операции.

3.3. Результаты морфологических методов исследования (гистологических, иммуногистохимических)

При проведении гистологического и иммуногистохимического исследований были проведены оценка количества двуядерных гепатоцитов в ткани печени, наличия фиброзных и воспалительных изменений, расчет индекса пролиферативной активности гепатоцитов.

Для оценки количества и соотношения одноядерных и двуядерных гепатоцитов в ткани печени проведено изучение срезов печени, окрашенных гематоксилином и эозином. При оценке количества одноядерных и двуядерных гепатоцитов во всех группах отмечалась сходная тенденция – увеличение количества двуядерных гепатоцитов с первых по 14-е сутки эксперимента на единицу площади (таблица 12).

Таблица 12 – Количество двуядерных гепатоцитов в ткани печени на единицу площади в группах исследования, усл. ед.

Сутки после резекции	Группа исследования		
	1 контрольная	2 контрольная	Опытная
1	141,67 [78;207]	150,67 [125;188]	159,83 [61;285]
5	188,33 [78;386]	206,17 [177;280]	203,33 [71;353]
7	249,33 ¹ [154;292]	269,33 ¹ [220;395]	373,50 [297;705]
14	365,67 ¹ [343;376]	307,00 ¹ [219;391]	415,83 [83;538]

Примечание: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками ($p < 0,05$)

При расчете соотношения одноядерных и двуядерных гепатоцитов наблюдалась аналогичная динамика. На 14-е сутки после резекции печени во всех группах был зарегистрирован наибольший процент количества двуядерных гепатоцитов (таблица 13): в 1-й контрольной группе – $7,13 \pm 0,37\%$, во 2-й контрольной – $8,02 \pm 1,53\%$, в опытной – $9,95 \pm 4,48\%$. Во всех группах исследования двуядерные гепатоциты располагались хаотично, специфической локализации относительно триад и печеночных долек выявлено не было. Двуядерные гепатоциты характеризовались увеличением размера и объема цитоплазмы в сравнении с одноядерными (рисунок 8,9).

Таблица 13 – Количество двуядерных гепатоцитов в ткани печени в группах исследования, % от общего количества гепатоцитов

Сутки после резекции	Группа исследования		
	1 контрольная	2 контрольная	Опытная
1	$3,07 \pm 0,84$	$3,24 \pm 0,59$	$3,64 \pm 2,22$
5	$5,12 \pm 4,27$	$5,12 \pm 0,91^1$	$5,22 \pm 2,89$
7	$6,29 \pm 1,88^1$	$7,14 \pm 1,94^1$	$8,06 \pm 2,97^1$
14	$7,13 \pm 0,37^1$	$8,02 \pm 1,53^1$	$9,95 \pm 4,48^1$

Примечание: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками ($p < 0,05$)

При изучении ткани печени во всех группах отмечалось увеличение процентного соотношения двуядерных от общего количества гепатоцитов с

первых по 14-е сутки, что демонстрирует значительное повышение пролиферативной активности печени после оперативного вмешательства. Отсутствие статистически достоверных различий между группами свидетельствует о незначительном влиянии внутрибрюшинного введения адеметионина и цианкобаламина на пролиферативную активность гепатоцитов и активацию митотического деления клетки.

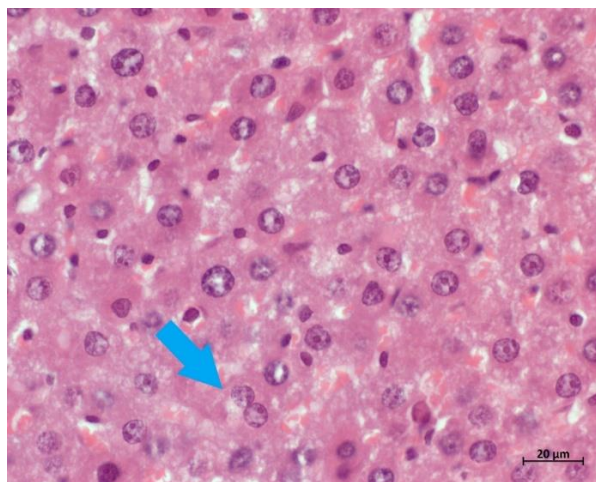


Рисунок 8 – 1-я контрольная группа. Стрелками отмечены двуядерные гепатоциты, характеризуются увеличением размера и объема цитоплазмы в сравнении с одноядерными. Их расположение в ткани печени хаотичное. 14 сутки после резекции печени. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: окрашивание гематоксилином и эозином. x20

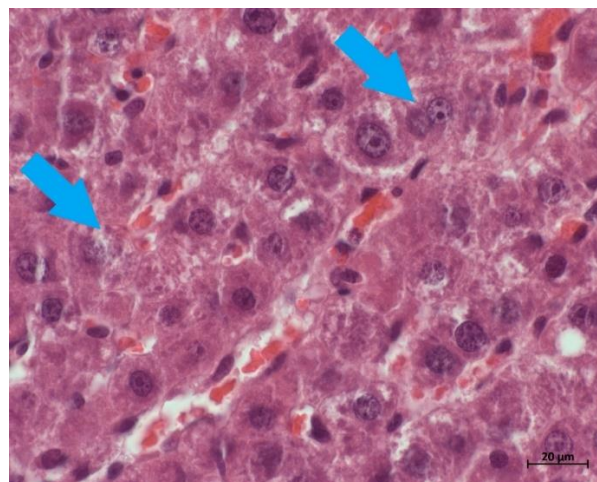


Рисунок 9 – Опытная группа. Стрелками отмечены двуядерные гепатоциты. Отмечается увеличение количества двуядерных гепатоцитов в сравнении с 1-й контрольной группой, их расположение в ткани печени хаотичное. 14 сутки после резекции печени. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: окрашивание гематоксилином и эозином. x20

Идентификацию ретикулярных волокон в строме печени выполняли с помощью гистохимических протоколов (импрегнация серебром). При оценке количества ретикулярных волокон в строме печени на 1-е сутки после резекции печени статистически значимых различий между группами выявлено не было. На 5-е сутки количество ретикулярных волокон на единицу площади в 1-й контрольной группе составило 5419,17 [5348; 5488] усл. ед., во 2-й контрольной – меньше на 8,54%, в опытной – 3,01%. На 7-е

сутки тенденция увеличения количества ретикулярных волокон в строме печени сохранялась, однако, статистически значимых различий между группами не отмечали. На 14-е сутки были отмечены максимальные значения данного показателя для всех групп животных: в 1-й контрольной - 6120,00 [5893; 6227] усл. ед, во 2-й контрольной – ниже на 5,84%, в опытной – на 5,56% (таблица 14).

Таблица 14 – Количество ретикулярных волокон в ткани печени на единицу площади в группах исследования, усл. ед.

Сутки после резекции	Группа исследования		
	1 контрольная	2 контрольная	Опытная
1	4402,67 [4286;4495]	4254,00 [4051;4436]	4057,00 [3965;4195]
5	5419,17 ² [5348;5488]	4956,67 ^{1,2} [4737;5082]	5256,83 ² [4625;5772]
7	5379,17 ² [5156;5562]	5317,33 ² [5124;5450]	5349,5 ² [5003;5710]
14	6120,00 ² [5893;6227]	5762,83 ^{1,2} [5602;5847]	5779,83 ² [5616;5994]

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-й контрольной группой ($p < 0,05$), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками ($p < 0,05$)

Расположение и толщина ретикулярных волокон во 2-й контрольной и опытной группах не имели значимых различий, в 1-й контрольной группе отмечались единичные уплотнения ретикулярной сети, ориентированные к периферии печеночных долек (рисунок 10, 11).

В связи с тем, что количество ретикулярных волокон во 2-й контрольной и опытной группах не превышало значения 1-й контрольной группы, можно говорить об отсутствии фиброзных изменений в ткани печени при внутрибрюшинном введении адеметионина и цианокобаламина после резекции печени, а также о том, что восстановление исходной массы печени было обеспечено преимущественно пролиферацией гепатоцитов.

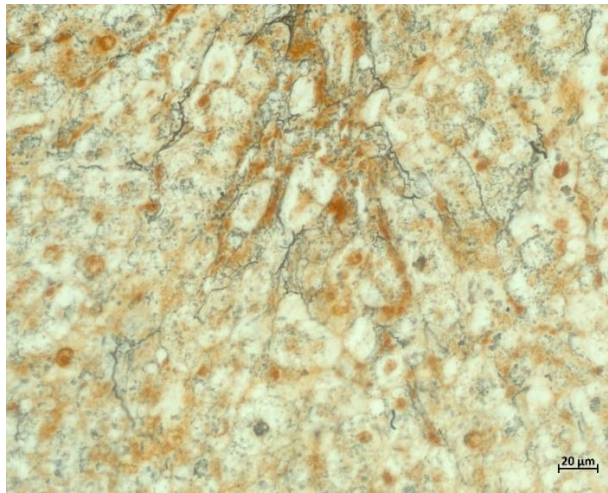


Рисунок 10 – 1 контрольная группа. Ретикулярные волокна печени. Единичные уплотнения ретикулярной сети, ориентированные к периферии печеночных долек. 14 сутки после резекции печени. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: импрегнация серебром. x20

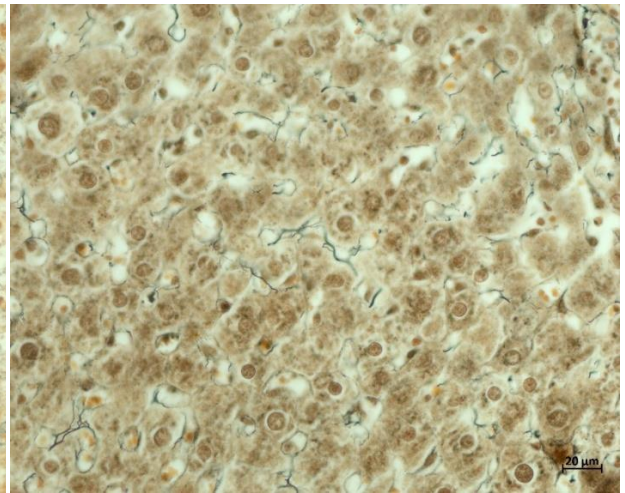


Рисунок 11 – Опытная группа. Ретикулярные волокна печени. Расположение и толщина ретикулярных волокон типична для строения печени без патологии. 14 сутки после резекции печени. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: импрегнация серебром. x20

С целью выявления изменений качества и количества коллагеновых волокон при окраске по Массону-Голднеру оценивали расположение, размер и количество коллагеновых волокон в строме печени. Изменения структуры печеночной ткани не было выявлено ни в одной из групп исследования. Толщина и расположение коллагеновых волокон во 2-й контрольной и опытной группах были идентичны и сравнимы с 1-й контрольной группой, периваскулярного фиброза не отмечалось (рисунок 12). Статистически значимых различий между группами выявлено не было

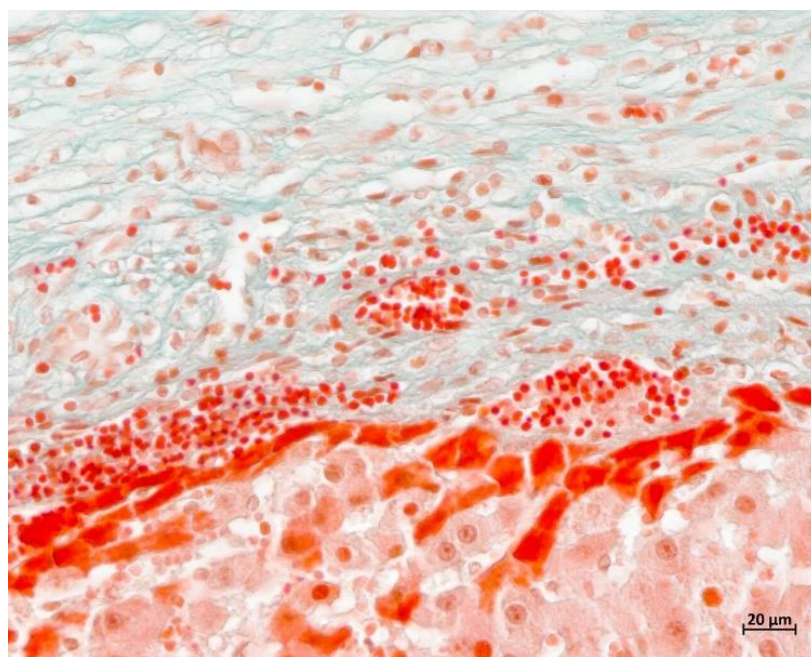


Рисунок 12 – Опытная группа. Коллагеновые волокна печени. Толщина и расположение коллагеновых волокон типично для печеночной ткани, периваскулярный фиброз отсутствует. 14 сутки после резекции печени. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: окрашивание по Массону-Голднеру. x20

При оценке индекса пролиферации гепатоцитов Ki-67 отмечали повышение данного показателя во всех группах исследования с первых по 7-е сутки после резекции (таблица 15).

Таблица 15 – Количество Ki-67-позитивных ядер гепатоцитов в ткани печени в группах исследования, %

Сутки после резекции	Группа исследования		
	1 контрольная	2 контрольная	Опытная
1	2,13±0,63	2,13±0,63	3,21±1,20
5	4,29±0,65 ²	5,12±1,24 ²	5,34±1,75 ²
7	5,49±0,33 ²	8,74±1,02 ^{1,2}	8,18±1,27 ^{1,2}
14	2,41±0,67	7,36±0,95 ^{1,2}	7,94±1,26 ^{1,2}

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-й контрольной группой (p<0,05), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками (p<0,05)

На 1-е и 5-е сутки статистически значимых различий между группами не наблюдали. Наибольшие показатели во всех группах были зарегистрированы

на 7-е сутки: в 1-й контрольной группе – $5,49 \pm 0,33\%$ (рисунок 13), во 2-й контрольной – $8,74 \pm 1,02\%$, в опытной – $8,18 \pm 1,27\%$ (рисунок 14). К 14-м суткам после резекции отмечали снижение индекса пролиферации в сравнении с 7-ми сутками, в 1-й контрольной группе на $3,08\%$, во 2-й контрольной – на $1,38\%$, в опытной – на $0,24\%$.

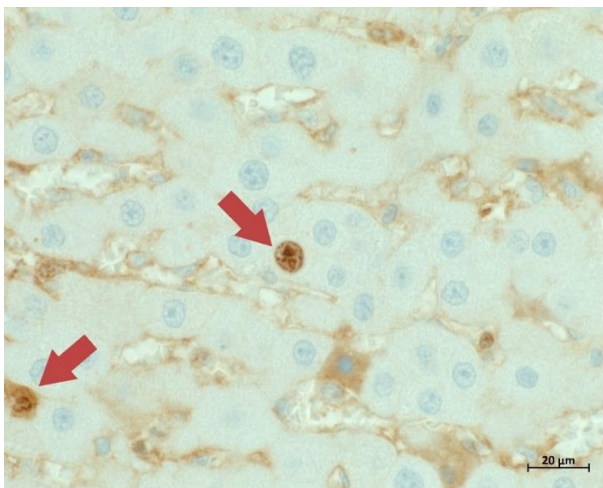


Рисунок 13 – 1 контрольная группа. Стрелками отмечены Ki-67-положительные ядра гепатоцитов. Ki-67-положительные ядра расположены в одноядерных гепатоцитах, расположение их хаотично. 7 сутки. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: иммуногистохимическое окрашивание белка Ki-67. x20

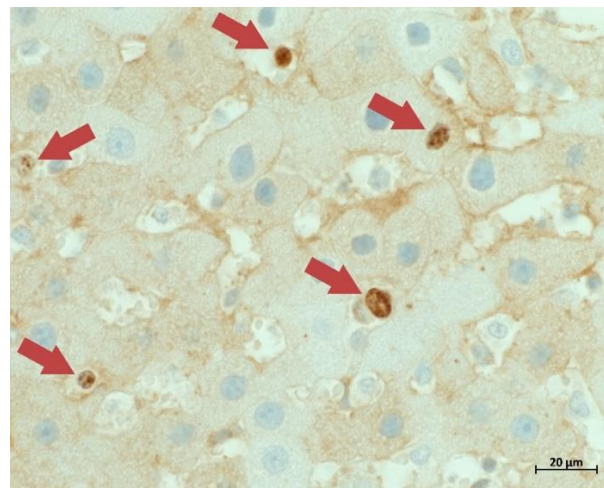


Рисунок 14 – 2 контрольная группа. Стрелками отмечены Ki-67-положительные ядра гепатоцитов, отмечается увеличение их количества в равнении с 1-й контрольной группой. 7 сутки. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: иммуногистохимическое окрашивание белка Ki-67. x20

Все Ki-67-положительные ядра гепатоцитов наблюдались в одноядерных клетках, что сопровождалось увеличением объема цитоплазмы гепатоцитов и появлением окрашенных ядрышек. Расположение клеток с Ki-67 позитивной реакцией было хаотичным, специфической ориентации относительно печеночных долек не наблюдалось.

При оценке количества тучных клеток на единицу площади достоверных различий между группами выявлено не было (таблица 16).

Таблица 16 – Количество тучных клеток в ткани печени на единицу площади в группах исследования, усл. ед.

Сутки после резекции	Группа исследования		
	1 контрольная	2 контрольная	Опытная
1	14,17 [9;20]	10,00 [0;17]	14,83 [4;26]
5	16,33 [3;42]	12,50 [3;30]	15,50 [0;40]
7	14,67 [10;21]	11,00 [0;30]	12,33 [7;20]
14	9,17 [5;14]	8,17 [0;17]	8,83 [0;28]

Наибольшее количество во всех группах было зарегистрировано на 5-е сутки после резекции: в 1-й контрольной группе 16,33 [3;42] усл. ед., во 2-й контрольной – ниже на 23,45%, в опытной – на 5,08%. К 14-м суткам наблюдалось снижение содержания тучных клеток в ткани печени во всех группах исследования. Расположение тучных клеток в группах исследования было идентично, чаще всего они встречались периваскулярно, что также может быть связано с изменением кровотока после резекции печени (рисунок 15).

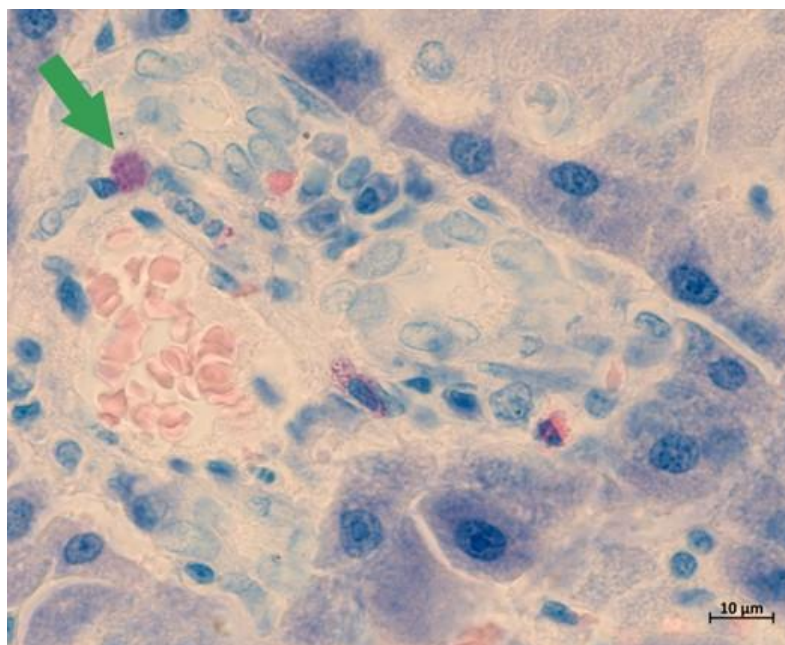


Рисунок 15 – 1 контрольная группа. Ткань печени. Стрелкой отмечена тучная клетка. Периваскулярное расположение тучных клеток. 1 сутки. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: окрашивание по Романовскому-Гимзе. x10

Таким образом, при оценке результатов гистологических и иммуногистохимических методов исследования было выявлено отсутствие выраженного влияния внутрибрюшинного введения адеметионина и цианокобаламина на вступление в митотический цикл малоактивных клеток, развитие фиброзных и воспалительных изменений в ткани печени, что подтверждается отсутствием достоверных различий между группами при подсчете количества двуядерных гепатоцитов, коллагеновых и ретикулярных волокон и тучных клеток. Следует отметить, что на 7-е сутки внутрибрюшинное введение адеметионина повышает индекс пролиферации на 3,28%, цианокобаламина – на 2,69%, в сравнении с контрольной группой.

Таким образом, исследования, проведенные в I блоке, демонстрируют преимущественное влияние внутрибрюшинного введения адеметионина на восстановление функциональной активности печени, что сопровождается снижением показателей синдромов цитолиза, холестаза, окислительного стресса, частичным восстановлением белково-синтетической функции печени и нормализации общего состояния у 77,8% животных на 5-е сутки после операции. Внутрибрюшинное введение цианокобаламина оказывает преимущественное влияние на азотистый обмен, повышение экспрессии факторов роста IL-1 β и TGF- β 1 и пролиферативной активности гепатоцитов, что приводит к восстановлению 85,26% от исходной массы печени на 14-е сутки после резекции.

ГЛАВА 4. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ИНТРАОПЕРАЦИОННОГО ВНУТРИПЕЧЕНОЧНОГО ВВЕДЕНИЯ ЦИАНОКОБАЛАМИНА И АДЕМЕТИОНИНА ПОСЛЕ РЕЗЕКЦИИ ПЕЧЕНИ (II БЛОК ИССЛЕДОВАНИЯ)

4.1. Результаты объективных методов исследования

Объективные методы включали в себя оценку общего состояния, расчет полученной массы печени при выведении животных из эксперимента.

Общее состояние животных во всех группах (n=72) в течение первых суток после операции соответствовало 3 баллам по шкале, предложенной В.А. Липатовым и соавт. [35]. Наблюдали отсутствие аппетита, реакция только на сильные раздражители. На 5-е сутки после резекции печени у 16,67% животных 1-й контрольной группы (ТРП + внутripеченочное введение 0,9% раствора NaCl) (n=18) наблюдалась нормализация общего состояния, во 2-й контрольной (ТРП + внутripеченочное введение адеметионина) – у 5,56% животных (n=18), в опытной (ТРП + внутripеченочное введение цианокобаламина) – у 100% (n=18). К 7-м суткам эксперимента у всех животных отмечали формирование окрепшего послеоперационного рубца, швы были сняты. В 1-й контрольной группе нормализация состояния отмечалась у 83,33% животных (n=12), во 2-й контрольной – у 75% (n=12). К 14-м суткам после резекции печени состояние всех животных опытной группы не отличалось от интактных, в 1-й (n=6) и 2-й (n=6) контрольных – у 83,33% животных. В области послеоперационной раны у всех животных отмечалось практически полное восстановление покрова шерсти.

При выведении животных из эксперимента и макроскопической оценке печеночной ткани в 1-й контрольной и опытной группах изменений не было выявлено. Во 2-й контрольной группе ткань печени была значительно

уплотнена, желто-коричневого цвета с темными вкраплениями, при разрезе отмечался характерный для цирротических изменений хруст.

На 1-е сутки после операции масса печени у всех животных составила не более 35,12% от исходной*. На 5-е сутки после резекции статистически значимых различий между группами не зарегистрировали (таблица 17). На 7-е сутки эксперимента в 1-й контрольной группе была зарегистрирована масса печени $10,25 \pm 1,48$ г, что составило 69,73% от исходной массы печени, во 2-й контрольной – $9,52 \pm 0,88$ г (67,66%); в 1-й опытной – $14,05 \pm 2,25$ г (85,05%). На 14-е сутки после резекции масса печени в 1-й контрольной группе составила 81,87% от исходной, во 2-й контрольной – 69,29%, в опытной – 95,27%.

Таблица 17 – Динамика массы печени в основной и контрольной группах исследования, г

Сутки после резекции	Группа исследования		
	1 контрольная	2 контрольная	Опытная
1	$4,35 \pm 0,55$	$5,02 \pm 0,45$	$4,73 \pm 0,69$
5	$8,33 \pm 2,05^2$	$6,28 \pm 0,44$	$8,60 \pm 1,39^2$
7	$10,25 \pm 1,48^2$	$9,52 \pm 0,88^2$	$12,45 \pm 1,56^2$
14	$10,68 \pm 0,98^2$	$9,67 \pm 1,15^2$	$14,05 \pm 2,25^{1,2}$

Примечание: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-й контрольной группой ($p < 0,05$), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками ($p < 0,05$)

Таким образом, наиболее быстрая нормализация общего состояния наблюдалась в опытной группе – у 100% животных на 5-е сутки после резекции печени, что превышало показатели 1-й контрольной группы на 83,33%, 2-й контрольной – на 94,44%. Следует отметить, что к 14-м суткам в контрольных группах у 16,67% животных нормализации общего состояния не отмечали.

При оценке восстановления исходной массы печени к 14-м суткам наилучшие показатели наблюдались в опытной группе – 95,27%, что

* Расчет исходной массы печени выполнен по формуле (см. стр. 47)

превышало показатели 1-й контрольной группы на 13,40%, 2-й контрольной – на 25,98%.

4.2. Результаты лабораторных методов исследования (биохимических, иммуноферментных)

При выполнении лабораторных исследований проводили оценку синдромов цитолиза, холестаза, печеночно-клеточной недостаточности, окислительного стресса, а также оценивали динамику факторов роста.

При изучении динамики показателей цитолитического синдрома – АСТ и АЛТ на 1-е сутки после операции наблюдали значительные отклонения от нормы у всех животных (таблица 18).

Таблица 18 – Динамика показателей цитолитического синдрома в группах исследования, Ед/л

Группа исследования	Показатели цитолитического синдрома	
	АЛТ	АСТ
1 сутки		
1 контрольная	105,67±7,45	75,67±2,94
2 контрольная	104,00±14,25	112,67±10,78 ¹
Опытная	93,00±4,77 ¹	61,67±3,27 ¹
5 сутки		
1 контрольная	101,83±5,88	65,83±3,13 ²
2 контрольная	140,50±16,65 ^{1,2}	193,83±13,17 ^{1,2}
Опытная	81,83±2,48 ^{1,2}	57,00±2,76 ¹
7 сутки		
1 контрольная	81,67±4,13 ²	62,50±3,94 ²
2 контрольная	119,83±11,05 ¹	100,00±9,61 ¹
Опытная	63,00±0,63 ^{1,2}	44,67±2,50 ^{1,2}
14 сутки		
1 контрольная	75,00±3,46 ²	55,17±2,93 ²
2 контрольная	104,67±10,19 ¹	86,17±4,96 ^{1,2}
Опытная	62,67±1,03 ^{1,2}	45,00±2,53 ^{1,2}

Примечание: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-й контрольной группой (p<0,05), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками (p<0,05)

Во всех группах изучаемые показатели превышали нормальные значения более чем на 25%, наибольшие результаты были зарегистрированы во 2-й контрольной группе: АСТ - $112,67 \pm 10,78$ Ед/л, в 1-й контрольной – ниже на 32,84%, в опытной – на 45,26%. К 5-м суткам после операции наблюдалось снижение показателей синдрома цитолиза в 1-й контрольной и опытной группах: уровень АЛТ в 1-й контрольной группе составил $101,83 \pm 5,88$ Ед/л, АСТ – $65,83 \pm 3,13$ Ед/л, в опытной – ниже на 19,64% и 13,41%, соответственно. Во 2-й контрольной группе на 5-е сутки были зарегистрированы максимальные значения синдрома цитолиза: АЛТ – $140,50 \pm 16,65$ Ед/л, АСТ – $193,83 \pm 13,17$ Ед/л, что превышало значения 1-й контрольной группы в 1,3 и 2,9 раза, соответственно. На 7-е сутки после резекции печени нормализация показателей наблюдалась в опытной группе, в контрольных группах отмечали лишь снижение АСТ и АЛТ в сравнении с 1-ми сутками. На 14 сутки показатели контрольных групп так же были завышены, в 1-й контрольной АЛТ составил – $75,00 \pm 3,46$ Ед/л, АСТ – $55,17 \pm 2,93$ Ед/л, во 2-й контрольной – выше на 39,56% и 56,19%, соответственно.

Таким образом, наибольшие показатели цитолиза были зарегистрированы во 2-й контрольной группе на 5-е сутки, что превышало показатели 1-й контрольной в 1,3 и 2,9 раза, соответственно. Нормализация АСТ и АЛТ отмечалась только в опытной группе на 7-е сутки после резекции печени.

При оценке показателей холестатического синдрома на 1-е сутки после операции наблюдалось значительное повышение уровней общего билирубина (БЛ), щелочной фосфатазы (ЩФ) и гаммаглутамилтранспептидазы (ГГТП) у всех животных. Наибольшие значения отмечали во 2-й контрольной группе: БЛ – $1,40 \pm 0,14$ Мкмоль/л, ЩФ – $397,50 \pm 22,11$ Ед/л, ГГТП – $11,22 \pm 0,80$ Ед/л. Различия между данными опытной и 1-й контрольной групп на 1-е и 5-е сутки

были статистически недостоверны. На 5-е сутки во 2-й контрольной группе отмечали повышение БЛ и ГГТП, снижение ЩФ, однако показатели ЩФ все еще превышали нормальные значения более чем в 2 раза. На 7-е сутки после резекции печени в опытной группе была зарегистрирована нормализация показателей ЩФ и ГГТП, БЛ составил $1,02 \pm 0,13$ мкмоль/л, что было на 8,11% ниже, чем в 1-й контрольной группе. На 7-е сутки после резекции печени отмечалось снижение ЩФ в 1-й контрольной группе на 9,06% и во 2-й контрольной – на 51,95% в сравнении с 1-ми сутками. К 14-м суткам в контрольных группах нормализации изучаемого показателя не регистрировали.

На 7-е сутки уровень ГГТП составил в 1-й контрольной группе $9,73 \pm 0,37$ Ед/л, во 2-й контрольной – был выше на 0,41%. На 14-е сутки исследования отмечали снижение ГГТП в контрольных группах в сравнении с 1-ми сутками, однако нормализации данного показателя не наблюдалось, различия были статистически недостоверны.

Уровень БЛ на 7-е сутки после резекции печени был значительно повышен во 2-й контрольной группе – $1,50 \pm 0,18$ мкмоль/л, что превышало значения 1-й контрольной группы на 35,14%. Между опытной и 1-й контрольной группами статистически значимых различий по данному показателю выявлено не было. На 14-е сутки нормализации данного показателя в контрольных группах не наблюдалось, в опытной – зарегистрировано у 66,67% животных.

ОХ с 1-е по 5-е сутки после операции был значительно ниже нормальных значений. На 7-е сутки в опытной группе была зарегистрирована нормализация ОХ – $1,90 \pm 0,04$ Ммоль/л, в 1-й контрольной группе данный показатель был ниже на 19,47%, во 2-й контрольной – на 11,58%. В контрольных группах на 14-е сутки после резекции печени ОХ был снижен: в

1-й контрольной группе данный показатель составил $1,72 \pm 0,12$ Ммоль/л, во 2-й контрольной – выше на 4,65% (таблица 19).

Таблица 19 – Динамика показателей холестатического синдрома в группах исследования

Показатель / Группа исследования	БЛ, мкмоль/л	ЩФ, Ед/л	ГГТП, Ед/л	ОХ, ммоль/л
1 сутки				
1 контрольная	$1,33 \pm 0,06$	$182,17 \pm 6,49$	$10,60 \pm 0,19$	$1,30 \pm 0,15$
2 контрольная	$1,40 \pm 0,14$	$397,50 \pm 22,11^1$	$11,22 \pm 0,80$	$1,45 \pm 0,12$
Опытная	$1,32 \pm 0,12$	$182,83 \pm 11,34$	$10,08 \pm 0,19$	$1,51 \pm 0,12$
5 сутки				
1 контрольная	$1,24 \pm 0,10$	$174,17 \pm 6,85$	$9,81 \pm 0,24$	$1,32 \pm 0,15$
2 контрольная	$1,58 \pm 0,16^1$	$288,50 \pm 26,14^1$	$11,35 \pm 0,59^1$	$1,62 \pm 0,19^1$
Опытная	$1,33 \pm 0,10$	$172,00 \pm 5,87$	$10,02 \pm 0,22$	$1,63 \pm 0,14^1$
7 сутки				
1 контрольная	$1,11 \pm 0,05^2$	$165,67 \pm 4,27^2$	$9,73 \pm 0,37$	$1,53 \pm 0,10$
2 контрольная	$1,50 \pm 0,18^1$	$191,00 \pm 7,92^{1,2}$	$9,77 \pm 0,62^2$	$1,68 \pm 0,15$
Опытная	$1,02 \pm 0,13^2$	$137,67 \pm 3,78^{1,2}$	$7,52 \pm 0,31^{1,2}$	$1,90 \pm 0,04^{1,2}$
14 сутки				
1 контрольная	$1,03 \pm 0,02^2$	$153,33 \pm 4,23^2$	$8,92 \pm 0,34^2$	$1,72 \pm 0,12^2$
2 контрольная	$1,25 \pm 0,14^1$	$164,50 \pm 8,22^2$	$9,13 \pm 0,72^2$	$1,80 \pm 0,15^2$
Опытная	$0,95 \pm 0,08^2$	$138,33 \pm 2,42^{1,2}$	$7,28 \pm 0,21^{1,2}$	$1,91 \pm 0,05^{1,2}$

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-й контрольной группой ($p < 0,05$), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками ($p < 0,05$)

Таким образом, максимальные показатели холестатического синдрома после резекции печени были зарегистрированы во 2-й контрольной группе: ЩФ – на 1-е сутки, БЛ и ГГТП – на 5-е сутки. В опытной группе на 7-е сутки после операции отмечали нормализацию ЩФ, ГГТП и ОХ. В контрольных группах нормализации показателей к 14-м суткам не регистрировали.

При оценке показателей синдрома печеночно-клеточной недостаточности наблюдалось значительное снижение белково-синтетической функции печени у всех животных, что подтверждалось показателями общего белка. На 1-е сутки

после резекции печени ОБ в 1-й контрольной группе составил $42,17 \pm 3,25$ г/л, во 2-й контрольной – $45,33 \pm 2,73$ г/л, в опытной – $48,83 \pm 2,56$ г/л. На 5-е сутки данный показатель повышался в 1-й контрольной и опытной группах, однако статистически значимых различий в сравнении с 1-ми сутками выявлено не было. Во 2-й контрольной группе отмечалось снижение ОБ до $33,67 \pm 2,88$ г/л. На 7-е сутки ОБ в 1-й контрольной группе составил $50,17 \pm 2,92$ г/л, во 2-й контрольной – $40,33 \pm 2,73$ г/л, в опытной – $49,17 \pm 3,87$ г/л. К 14-м суткам после резекции наблюдали повышение ОБ во всех группах: в 1-й контрольной группе – $55,83 \pm 2,71$ г/л, во 2-й контрольной – $48,50 \pm 2,88$ г/л, в опытной – $62,50 \pm 1,64$ г/л. Следует отметить, что наибольшее значение изучаемого показателя регистрировали в опытной группе, однако его нормализации не наблюдали.

После резекции печени наблюдали нарушение углеводного и азотистого обменов, что подтверждалось отклонениями показателей ГЛ, КР и МЧ. Глюкоза крови была повышена с первых по 14-е сутки эксперимента в контрольных группах (таблица 20), в которых нормализации данного показателя не регистрировали. В опытной группе к 7-м суткам наблюдали нормализацию показателя у 84% животных, к 14-м суткам – у 100%.

Таблица 20 – Динамика глюкозы в группах исследования, ммоль/л

Сутки после операции	Группа исследования		
	1 контрольная	2 контрольная	Опытная
1	$10,88 \pm 0,31$	$10,78 \pm 0,46$	$10,58 \pm 0,38$
5	$10,82 \pm 0,35$	$11,77 \pm 0,47^{1, 2}$	$10,82 \pm 0,23$
7	$10,20 \pm 0,38$	$9,38 \pm 3,73^2$	$8,50 \pm 0,42^{1, 2}$
14	$9,82 \pm 0,43^2$	$9,78 \pm 0,31^2$	$8,52 \pm 0,27^{1, 2}$

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-й контрольной группой ($p < 0,05$), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками ($p < 0,05$)

При оценке показателей азотистого обмена отмечали повышение МЧ и КР у всех животных на 1-е сутки после резекции печени. МЧ в 1-й контрольной группе составила $7,64 \pm 0,22$ ммоль/л, КР- $42,50 \pm 2,35$ мкмоль/л, во

2-й контрольной МЧ – $8,42 \pm 0,41$ ммоль/л, КР – $50,17 \pm 3,25$ мкмоль/л, в опытной – $8,00 \pm 0,14$ ммоль/л и $47,33 \pm 2,58$ мкмоль/л, соответственно. На 5-е сутки во 2-й контрольной группе отмечали значительное повышение МЧ – до $9,40 \pm 0,64$ ммоль/л и КР – $53,67 \pm 0,22$ мкмоль/л. При оценке МЧ в опытной группе, статистически значимых различий в сравнении с 1-й контрольной выявлено не было, КР в 1-й контрольной составил $44,17 \pm 1,94$ мкмоль/л, в опытной – ниже на 9,06%. На 7-е сутки после резекции печени показатели МЧ и КР возрастали во 2-й контрольной группе до $9,78 \pm 1,08$ ммоль/л и $56,82 \pm 3,92$ мкмоль/л, соответственно. КР в 1-й контрольной группе составил $41,50 \pm 1,38$ мкмоль/л, МЧ – $8,10 \pm 0,16$ ммоль/л, в опытной – ниже на 14,46% и 9,26%, соответственно. Таким образом на 7-е сутки после операции в опытной группе отмечали нормализацию показателей азотистого обмена. К 14-м суткам показатели 1-й контрольной группы также приходили к нормальным значениям, во 2-й контрольной группе МЧ составила $8,90 \pm 0,65$ ммоль/л, КР – $46,83 \pm 3,76$ мкмоль/л.

Таким образом, при оценке показателей синдрома печеночно-клеточной недостаточности наблюдалось значительное снижение белково-синтетической функции печени, нарушение углеводного и азотистого обменов у всех животных после резекции печени. В опытной группе на 7-е сутки отмечали нормализацию уровней ГЛ, КР и МЧ. В 1-й контрольной наблюдалась нормализация показателей азотистого обмена, однако глюкоза была повышена. Во 2-й контрольной группе все показатели имели значительные отклонения. Общий белок был значительно снижен во всех группах, нормализации данного показателя к 14-м суткам не отмечали, наилучшие его значения были зарегистрированы в опытной группе – на 8,09% ниже нормы.

При анализе липидного профиля, включающего в себя оценку ТГ, ЛПВП, ЛПНП, ЛПОНП и КАГ, были отмечены следующие результаты (таблица 21):

на 1-е сутки после операции статистически значимых различий между группами не наблюдалось.

Таблица 21 – Динамика показателей липидного профиля в группах исследования

Группа исследования	Показатель липидного профиля				
	ТГ, ммоль/л	ЛПВП, ммоль/л	ЛПНП, ммоль/л	ЛПОНП, ммоль/л	КАГ
1 сутки					
1 контрольная	0,032 ±0,004	0,045 ±0,001	1,241 ±0,162	0,014 ±0,002	1,343 ±0,136
2 контрольная	0,032 ±0,004	0,067 ±0,022	1,369 ±0,132	0,014 ±0,002	1,238 ±0,084
Опытная	0,037 ±0,008	0,042 ±0,010	1,458 ±0,122	0,017 ±0,004	1,423 ±0,172
5 сутки					
1 контрольная	0,045 ±0,005 ²	0,007 ±0,001 ²	1,226 ±0,146	0,020 ±0,002 ²	1,252 ±0,038
2 контрольная	0,045 ±0,005 ²	0,057 ±0,026	1,540 ±0,181	0,020 ±0,002 ²	1,461 ±0,265
Опытная	0,053 ±0,190 ²	0,620 ±0,534 ^{1,2}	0,771 ±0,493 ²	0,242 ±0,085 ^{1,2}	1,857 ±0,676
7 сутки					
1 контрольная	0,047 ±0,008 ²	0,152 ±0,120 ²	1,360 ±0,115	0,021 ±0,004 ²	1,439 ±0,681
2 контрольная	0,047 ±0,008 ²	0,028 ±0,147	1,634 ±0,150 ^{1,2}	0,021 ±0,004 ²	2,071 ±0,103 ^{1,2}
Опытная	0,9±0 ^{1,2}	1,110 ±0,017 ^{1,2}	0,384 ±0,042 ^{1,2}	0,410±0 ^{1,2}	1,369 ±0,005
14 сутки					
1 контрольная	0,058 ±0,022 ²	0,300 ±0,089 ²	1,390 ±0,172	0,027 ±0,010 ²	1,107 ±0,061 ²
2 контрольная	0,060 ±0,024 ²	0,023 ±0,010 ^{1,2}	1,750 ±0,194 ^{1,2}	0,027 ±0,010 ²	2,420 ±1,016 ^{1,2}
Опытная	0,9±0 ^{1,2}	1,161 ±0,044 ^{1,2}	0,341 ±0,057 ^{1,2}	0,410±0 ^{1,2}	1,353 ±0,014 ¹

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-й контрольной группой (p<0,05), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками (p<0,05)

На 5-е сутки отмечали выраженное нарушение жирового обмена, ТГ, ЛПВП были значительно ниже нормы, КАГ и ЛПНП у всех животных были завышены. На 7-е сутки эксперимента в опытной группе наблюдалась нормализация ТГ и ЛПВП, показатель ЛПНП был выше нормы на 2,86%. В 1-й контрольной группе показатели ТГ, ЛПВП и ЛПНП отличались от нормальных более чем на 50%. Во 2-й контрольной группе ТГ и ЛПВП значительно снижались, однако ЛПНП превышали нормальные значения более чем в 4 раза. ЛПОНП на 7-е сутки в 1-й и 2-й контрольных группах составили $0,021 \pm 0,004$ ммоль/л, в опытной – $0,410$ ммоль/л. К 14-м суткам после резекции печени отмечали нормализацию ЛПНП в опытной группе. В контрольных группах нормализации показателей не наблюдалось. КАГ у всех животных на протяжении эксперимента был значительно завышен, наибольший показатель был зарегистрирован во 2-й контрольной группе на 1-е сутки.

Таким образом, при оценке липидного профиля нормализация более чем 50% показателей наблюдалась только в опытной группе. Наибольший дисбаланс жирового обмена наблюдался во 2-й контрольной группе. Следует отметить повышение коэффициента атерогенности у всех животных, что подтверждает дисфункцию обменных процессов.

Для оценки оксидативного стресса проводили определение активности систем антиоксидантной защиты /ГП, ГР, СОД, GSH/, продуктов перекисного окисления липидов /МДА/ и белков /ДНФГ-производные/. В группах исследования наблюдалась сходная динамика показателей – повышение активности систем антиоксидантной защиты на 5-е и 7-е сутки исследования. Наибольшая активность ферментативной системы защиты была отмечена в опытной группе. На 5-е сутки: ГР - $0,034 \pm 0,005$ Е/мл, на 7-е сутки СОД - $0,605 \pm 0,087$ Ед/мл, что превышало значения 1-й контрольной группы на 21,43% и 86,73%, соответственно. Максимальная активность неферментативной системы так же была зарегистрирована в опытной группе

на 7-е сутки после резекции печени GSH составили $107,228 \pm 4,760$ мг%, что превышало значения 1-й контрольной группы на 39,05%. Следует отметить значительное снижение активности систем антиоксидантной защиты во 2-й контрольной группе, наименьшие показатели зарегистрированы на 14-е сутки после операции: ГП – на 20,00% ниже 1-й контрольной группы, ГР – на 42,86%, СОД – на 18,65%, GSH – на 37,84% (таблица 22).

Таблица 22 – Динамика показателей системы антиоксидантной защиты в группах исследования

Группа исследования	Показатели системы антиоксидантной защиты			
	ГП, Е/мл	ГР, Е/мл	СОД, Ед/мл	GSH, мг%
1 сутки				
1 контрольная	$0,186 \pm 0,028$	$0,021 \pm 0,001$	$0,375 \pm 0,082$	$88,797 \pm 7,329$
2 контрольная	$0,168 \pm 0,014^1$	$0,019 \pm 0,002$	$0,296 \pm 0,048$	$75,382 \pm 3,770^1$
Опытная	$0,170 \pm 0,018$	$0,016 \pm 0,005$	$0,532 \pm 0,082^1$	$89,725 \pm 7,720$
5 сутки				
1 контрольная	$0,203 \pm 0,014^2$	$0,028 \pm 0,004^2$	$0,384 \pm 0,047$	$83,478 \pm 4,668$
2 контрольная	$0,178 \pm 0,005^{1,2}$	$0,022 \pm 0,003$	$0,346 \pm 0,023^2$	$81,292 \pm 4,149$
Опытная	$0,201 \pm 0,011^2$	$0,034 \pm 0,005^{1,2}$	$0,592 \pm 0,066^1$	$84,272 \pm 5,645$
7 сутки				
1 контрольная	$0,194 \pm 0,019^2$	$0,019 \pm 0,002$	$0,324 \pm 0,046$	$77,117 \pm 5,156^2$
2 контрольная	$0,164 \pm 0,006^{1,2}$	$0,015 \pm 0,003$	$0,357 \pm 0,026$	$71,645 \pm 2,372^2$
Опытная	$0,192 \pm 0,015^2$	$0,022 \pm 0,004^2$	$0,605 \pm 0,087^1$	$107,228 \pm 4,760^{1,2}$
14 сутки				
1 контрольная	$0,165 \pm 0,022^2$	$0,014 \pm 0,003^2$	$0,311 \pm 0,051$	$83,868 \pm 4,879$
2 контрольная	$0,132 \pm 0,008^{1,2}$	$0,008 \pm 0,005^2$	$0,253 \pm 0,019$	$52,135 \pm 4,459^{1,2}$
Опытная	$0,165 \pm 0,013^2$	$0,014 \pm 0,002$	$0,527 \pm 0,064^1$	$86,690 \pm 5,653$

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-й контрольной группой ($p < 0,05$), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками ($p < 0,05$)

При оценке динамики МДА отмечалось повышение данного показателя во всех группах исследования, что было обосновано активностью систем антиоксидантной защиты. Максимальный показатель на 1-е сутки после резекции печени был зарегистрирован во 2-й контрольной группе – $30,30 \pm 3,19$ нмоль/л, что превышало значения 1-й контрольной группы на 30,43%. На 5-е сутки МДА в 1-й контрольной группе составил $22,39 \pm 3,50$

нмоль/л, во 2-й контрольной – выше на 26,31%, в опытной – ниже на 32,20%. На 7-е сутки наибольший показатель зарегистрирован во 2-й контрольной группе – 30,16±3,89 нмоль/л, в 1-й контрольной ниже данных значений на 20,19%, в опытной – на 52,32%. К 14-м суткам показатель МДА снижался во всех группах исследования, в 1-й контрольной группе составил 20,76±3,20 нмоль/л, нмоль/л, во 2-й контрольной и опытной группах – 26,19±3,80 нмоль/л и 12,64±1,46 нмоль/л, соответственно (таблица 23).

Таблица 23 – Динамика показателей перекисного окисления липидов в группах исследования

Сутки после резекции	Группа исследования		
	1 контрольная	2 контрольная	Опытная
МДА, нмоль/л			
1	23,23±5,03	30,30±3,19	15,59±4,16 ¹
5	22,39±3,50	28,28±3,74	15,18±2,82 ¹
7	24,07±4,30	30,16±3,89	14,38±2,65 ¹
14	20,76±3,20	26,19±3,80	12,64±1,46 ¹
ДНФГ, Ед/г белка			
1	2,42±0,26	2,63±0,29	2,27±0,12
5	2,46±0,10	2,81±0,23 ¹	2,15±0,05 ¹
7	2,76±0,24	2,99±0,11	2,06±0,15 ¹
14	2,75±0,29	3,41±0,25 ^{1,2}	2,03±0,29 ¹

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-й контрольной группой (p<0,05), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками (p<0,05)

Одним из показателей накопления продуктов окисления являлась динамика ДНФГ в крови животных. На 5-е и 7-е сутки статистически значимых различий в группах в сравнении с 1-ми сутками не отмечалось. На 14-е сутки после резекции печени ДНФГ в 1-й контрольной группе составил 2,75±0,29 Ед/г белка, во 2-й контрольной выше данных значений на 24,00%, в опытной – ниже на 26,18% (таблица 24).

Таким образом при оценке активности систем антиоксидантной защиты и динамики продуктов окисления, наибольшая активность ферментативной системы защиты отмечалась на 5-е и 7-е сутки после

резекции печени, максимальные показатели зарегистрированы в опытной группе, при этом наблюдали значительное снижение продуктов окисления. В большей степени окислительный стресс был выражен во 2-й контрольной группе, что подтверждается накоплением продуктов окисления, при этом активность систем защиты была значительно снижена.

При оценке стимуляции экспрессии первичных и вторичных митогенов в ткани печени отмечали повышение концентрации IL-1 β и TGF- β 1 на 5-е и 7-е сутки после резекции печени у всех животных (таблица 24).

Таблица 24 – Динамика экспрессии факторов роста в группах исследования, пг/мл

Показатель	Группа исследования		
	1 контрольная	2 контрольная	Опытная
1 сутки			
IL-1 β	21,44 [17,67;25,68]	20,37 [16,45;25,14]	34,89 ¹ [29;41,25]
TGF- β 1	2116,86 [1856;2785]	1629,67 [1124;1806]	4147,04 [3854;4562] ¹
5 сутки			
IL-1 β	38,59 ² [31,14;47,12]	31,06 ¹ [24,21;36,15]	70,05 ^{1,2} [59,99;78,95]
TGF- β 1	2885,17 ² [2354;3214]	2237,50 ² [1854;2648]	4337,50 ¹ [4056;4751]
7 сутки			
IL-1 β	31,43 ² [24,54;39]	24,02 [20,14;30,24]	92,68 ^{1,2} [86;101,45]
TGF- β 1	3080,33 ² [2451;3984]	2028,67 ¹ [1560;2451]	4609,34 ¹ [4282;5120]
14 сутки			
IL-1 β	16,06 [10,25;18,21]	11,12 [7,56;15,24]	27,22 ¹ [21,59;32,15]
TGF- β 1	1371,50 ² [1169;1754]	1169,17 ² [1106;1245]	1469,06 ² [1245;2106]

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-й контрольной группой (p<0,05), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками (p<0,05)

На 1-е сутки статистически значимых различий в контрольных группах исследования не отмечали. Показатели опытной группы превышали данные 1-й контрольной, IL-1 β - на 62,73% и TGF- β 1 – на 95,91%. Максимальные значения были зарегистрированы на 7-е сутки в опытной группе: IL-1 β - 92,68 [86;101,45] пг/мл, TGF- β 1 – 4609,34 [4282;5120] пг/мл. Показатели 2-й контрольной группы составили: IL-1 β - на 23,58% и TGF- β 1 – на 34,14% в сравнении с 1-й контрольной группой. К 14-м суткам отмечалось снижение IL-1 β и TGF- β 1 у всех животных, статистически значимых различий между контрольными группами не выявили, в опытной группе IL-1 β превышал значения 1-й контрольной группы на 69,49%, TGF- β 1 – на 7,11%.

Таким образом, оценка динамики показателей экспрессии факторов роста демонстрирует значительное повышение показателей IL-1 β и TGF- β 1 в опытной группе, более чем в 2 раза в сравнении с 1-й контрольной группой. Во 2-й контрольной группе отмечается снижение концентрации первичных и вторичных митогенов.

При оценке лабораторных показателей наблюдается практически полная нормализация показателей синдромов цитолиза и холестаза в опытной группе, восстановление углеводного и жирового обменов, снижение окислительного стресса, повышение экспрессии факторов роста. Следует отметить, что нормализации белковосинтетической функции в контрольных группах не отмечалось, частичное восстановление было зарегистрировано в опытной группе. Во 2-й контрольной группе выявлены значительные нарушения функции печени, которые не восстанавливались к 14-м суткам после резекции, снижение защитных антиоксидантных свойств, показателей IL-1 β и TGF- β 1.

4.3. Результаты морфологических методов исследования (гистологических, иммуногистохимических)

При проведении гистологического и иммуногистохимического исследований была проведена оценка количества двуядерных гепатоцитов в

ткани печени, наличия фиброзных и воспалительных изменений, расчет индекса пролиферативной активности гепатоцитов.

Для оценки количества и соотношения одноядерных и двуядерных гепатоцитов проведено изучение срезов печени, окрашенных гематоксилином и эозином. При оценке количества одноядерных и двуядерных гепатоцитов в контрольных группах отмечалась сходная тенденция – увеличение количества двуядерных гепатоцитов с первых по 7-е сутки эксперимента, в опытной группе с первых по 14-е сутки (таблица 25).

Таблица 25 – Количество двуядерных гепатоцитов в ткани печени на единицу площади, усл. ед.

Сутки после резекции	Группа исследования		
	1 контрольная	2 контрольная	Опытная
1	119,17 [55;303]	84,83 [56;99]	210,833 [115;384]
5	140,50 [71;267]	114,17 [68;163]	255,5 ¹ [192;325]
7	249,33 [187;317]	150,83 ^{1,2} [86;188]	503,83 ^{1,2} [457;650]
14	215,67 [173;263]	111,33 ¹ [74;137]	748,17 ^{1,2} [709;787]

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-й контрольной группой ($p < 0,05$), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками ($p < 0,05$)

На 1-е сутки после резекции печени статистически значимых различий между группами выявлено не было. Количество и расположение двуядерных гепатоцитов было сходным, они характеризовались увеличением в размере, в сравнении с одноядерными. На 5-е сутки наибольший показатель наблюдался в опытной группе - 255,5 [192;325] усл. ед., что превышало показатели 1-й контрольной группы на 81,85%. Во 2-й контрольной – отмечалось снижение количества двуядерных гепатоцитов на 18,74% в сравнении с 1-й контрольной группой. Максимальные показатели были зарегистрированы в контрольных группах на 7-е сутки, в 1-й контрольной – 249,33 [187;317] усл. ед., во 2-й контрольной – ниже на 39,51%, в опытной группе на 14-е сутки – 748,17 [709;787] усл. ед. (рисунок 16, 17, 18). Следует отметить, что в группах исследования двуядерные гепатоциты располагались

хаотично, без специфической ориентировки относительно печеночных долек. В опытной группе встречались единичные двуядерные гепатоциты с неполностью разделенным ядром, что связано с вступлением в митоз малоактивных клеток и замедленным делением клетки.

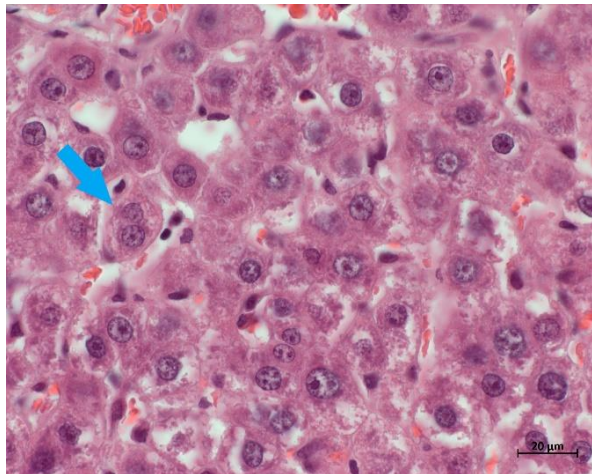


Рисунок 16 – 1 контрольная группа. Ткань печени. Стрелками отмечены двуядерные гепатоциты. 14 сутки. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: окрашивание гематоксилином и эозином. x20

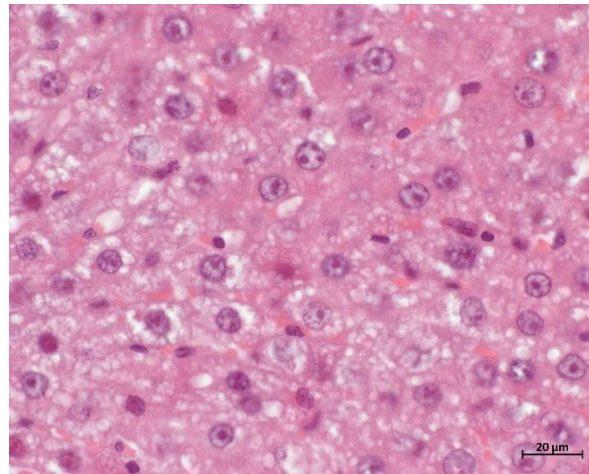


Рисунок 17 – 2 контрольная группа. Ткань печени. Характерно отсутствие двуядерных гепатоцитов. 14 сутки. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: окрашивание гематоксилином и эозином. x20

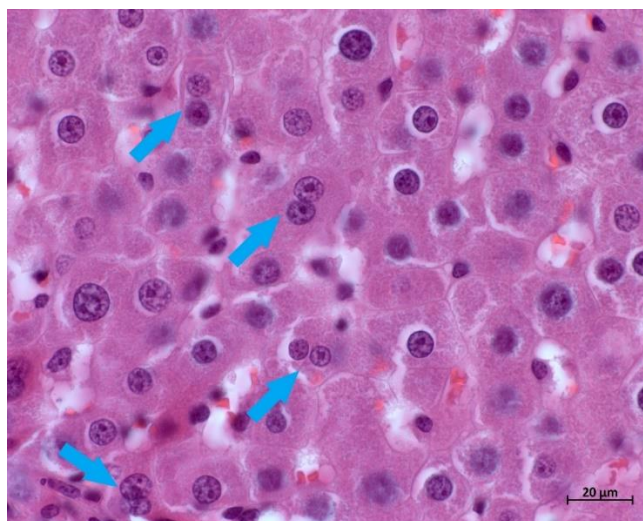


Рисунок 18 – Опытная группа. Ткань печени. Стрелками отмечены двуядерные гепатоциты, которые превосходят в размере одноядерные, расположены хаотично. Отмечается увеличение их количества в сравнении с 1-й контрольной группой. 14 сутки. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: окрашивание гематоксилином и эозином. x20

При изучении ткани печени во всех группах отмечалось увеличение количества двуядерных гепатоцитов, что демонстрирует значительное повышение их пролиферативной активности после оперативного вмешательства. Полученные максимальные значения в опытной группе демонстрируют выраженное влияние внутрипеченочного введения цианокобаламина на пролиферативную активность гепатоцитов и активацию митотического деления клеток, в том числе малоактивных.

Идентификацию ретикулярных волокон в строме печени выполняли с помощью гистохимических протоколов (импрегнация серебром). При оценке количества ретикулярных волокон в строме печени на 1-е сутки после ее резекции статистически значимых различий между группами выявлено не было (таблица 26).

Таблица 26 – Количество ретикулярных волокон в ткани печени на единицу площади, усл. ед.

Сутки после резекции	Группа исследования		
	1 контрольная	2 контрольная	Опытная
1	4757,83 [4643;4816]	4434,67 [3967;4718]	4789,00 [4581;4878]
5	4685,00 [4428;4975]	7067,67 ^{1, 2} [6749;7336]	5226,83 ^{1, 2} [5088;5344]
7	4768,17 [4507;5047]	10526,20 ^{1, 2} [10351;10708]	5392,33 ^{1, 2} [5135;5748]
14	4801,83 [4514;5069]	11475,00 ^{1, 2} [11385;11632]	5030,33 [5003;6962]

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-й контрольной группой ($p < 0,05$), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками ($p < 0,05$)

На 5-е сутки количество ретикулярных волокон на единицу площади в 1-й контрольной группе составило 4685,00 [4428;4975] усл. ед, во 2-й контрольной – выше на 50,86%, в опытной – на 11,27%. На 7-е сутки тенденция увеличения количества ретикулярных волокон в строме печени сохранялась, наибольший показатель был зарегистрирован во 2-й

контрольной группе - 10526,20 [10351;10708] усл. ед, что превышало значения 1-й контрольной группы в 2,21 раза. На 14-е сутки были отмечены максимальные значения данного показателя для всех групп животных: в 1-й контрольной - 4801,83 [4514;5069] усл. ед., во 2-й контрольной – выше в 2,39 раза, в опытной – выше на 4,76%. Следует отметить, что достоверных различий между 1-й контрольной и опытной группами не отмечали.

Расположение и толщина ретикулярных волокон в опытной группе не имели значимых различий в сравнении с 1-й контрольной (рисунок 19). Во 2-й контрольной группе (рисунок 20) отмечалось утолщение ретикулярных волокон, учащение их пересечений друг с другом с формированием плотной ретикулярной сети, следует отметить, что наибольшее количество ретикулярных волокон располагалось по периферии печеночных долек.

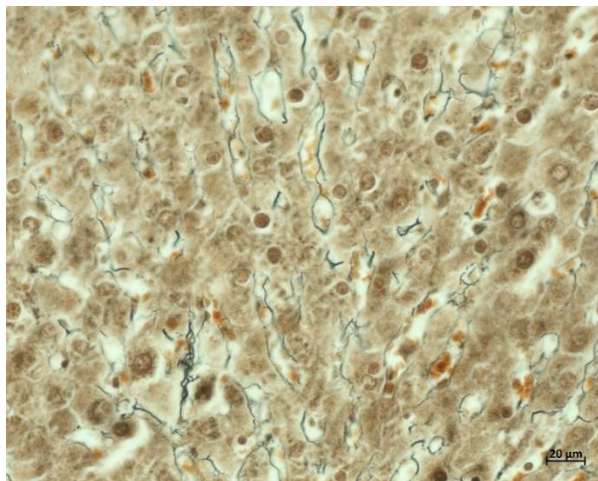


Рисунок 19 – 1 контрольная группа. Ретикулярные волокна печени. Расположение и толщина ретикулярных волокон характерна для нормальной структуры печени. 14 сутки. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: импрегнация серебром. x20.

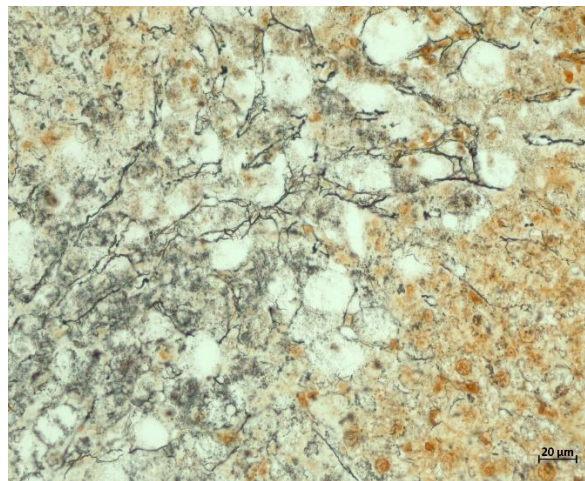


Рисунок 20 – 2 контрольная группа. Ретикулярные волокна печени. Утолщение ретикулярных волокон в сравнении с 1-й контрольной группой, формирование плотной ретикулярной сети. 14 сутки. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: импрегнация серебром. x20

Можно утверждать об отсутствии фиброзных изменений в ткани печени при внутripеченочном введении цианокобаламина после резекции печени, а также о том, что восстановление исходной массы печени было

обеспечено преимущественно пролиферацией гепатоцитов. Наличие значительного увеличения количества ретикулярных волокон во 2-й контрольной группе свидетельствует о наличии фиброзных и цирротических изменений печеночной ткани.

С целью выявления изменений качества и количества коллагеновых волокон оценивали расположение, выполняли окрашивание по Массону-Голднеру (рисунок 21, 22).

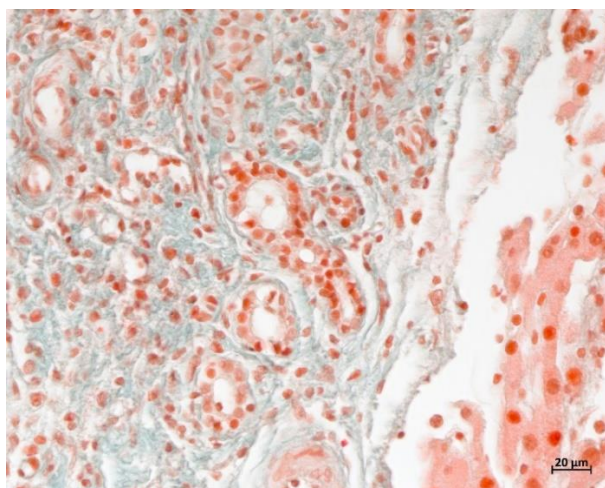


Рисунок 21 – 1 контрольная группа. Ткань печени с типично расположенными, не утолщенными коллагеновыми волокнами. 14 суток. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: окрашивание по Массону-Голднеру. x20

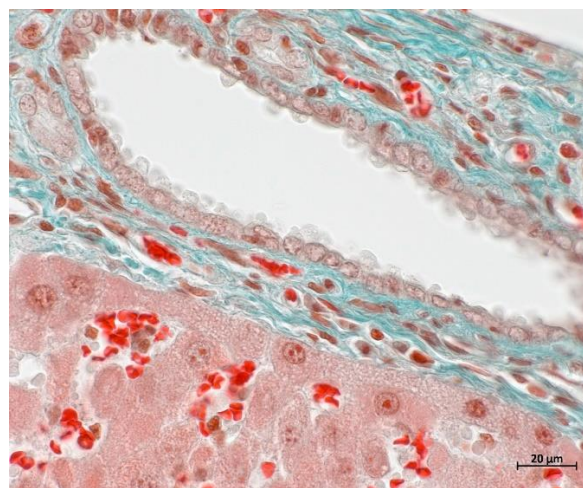


Рисунок 22 – 2 контрольная группа. Ткань печени с измененными коллагеновыми волокнами. Увеличение количества коллагеновых волокон в сравнении с 1-й контрольной группой, периваскулярный фиброз. 14 суток. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: окрашивание по Массону-Голднеру. x20

Изменения структуры печеночной ткани не было выявлено в 1-й контрольной и опытной группах. Параметры и расположение коллагеновых волокон в опытной группе были идентичны и сравнимы с 1-й контрольной группой (рисунок 21). Во 2-й контрольной группе отмечалось увеличение количества и утолщение коллагеновых волокон, отмечали скопление коллагеновых волокон по периферии печеночных долек, формирование

периваскулярного фиброза. Ближе к периферии печеночных долек были отмечены единичные очаги замещения печеночной ткани скоплением коллагеновых волокон (рисунок 22).

При оценке индекса пролиферации гепатоцитов Ki-67 отмечали повышение данного показателя в контрольных группах с 1-х по 7-е сутки после резекции (таблица 27).

Таблица 27 – Количество Ki-67-позитивных ядер гепатоцитов в ткани печени, %

Сутки после резекции	Группа исследования		
	1 контрольная	2 контрольная	Опытная
1	1,67±1,01	2,35±0,10 ¹	5,55±1,14 ¹
5	4,16±0,72 ²	3,36±0,14 ²	22,08±7,03 ^{1,2}
7	5,59±0,70 ²	4,43±0,86 ²	21,78±2,34 ^{1,2}
14	3,76±1,04 ²	3,15±0,40 ²	14,42±2,40 ^{1,2}

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с 1-й контрольной группой (p<0,05), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками (p<0,05)

На 1-е сутки наименьший показатель наблюдался в 1-й контрольной группе – 1,67±1,01%, во 2-й контрольной группе данный показатель был выше на 40,72%, в опытной – в 3,32 раза. На 5-е сутки статистически значимых различий между контрольными группами не наблюдали (рисунок 23), в опытной группе был зарегистрировано максимальное среднее значение показателя - 22,08±7,03% (рисунок 24). Основная масса Ki67-положительных ядер гепатоцитов наблюдалась в одноядерных клетках, что сопровождалось увеличением объема цитоплазмы гепатоцитов и появлением окрашенных ядрышек клетки. Следует отметить, что только в опытной группе отмечали единичные двуядерные гепатоциты с Ki-67-положительными ядрами (рисунок 24). Расположение клеток с Ki-67-позитивной реакцией было хаотичным, специфической ориентации относительно печеночных долек не наблюдалось.

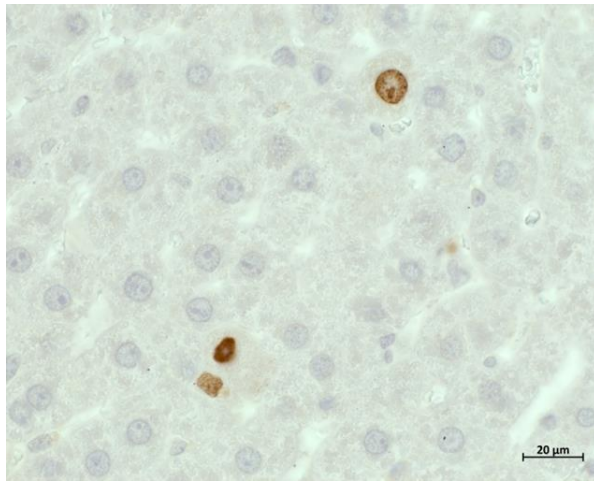


Рисунок 23 – 1 контрольная группа. Ткань печени с Ki-67-позитивными ядрами гепатоцитов. 5 сутки. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: иммуногистохимическое окрашивание белка Ki-67. x20

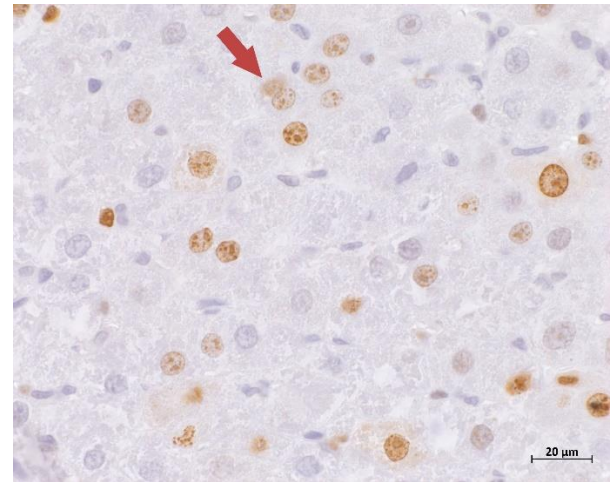


Рисунок 24 – Опытная группа. Ткань печени с Ki-67-позитивными ядрами гепатоцитов. Увеличение количества Ki-67-позитивных ядер гепатоцитов, в сравнении с 1-й контрольной группой. Стрелкой отмечен двуядерный гепатоцит с Ki67-позитивными ядрами. 5 сутки. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: иммуногистохимическое окрашивание белка Ki-67. x20

Наибольшие показатели в контрольных группах были зарегистрированы на 7-е сутки: в 1-й контрольной группе – $5,59 \pm 0,70$, во 2-й контрольной – ниже на 20,75%. К 14-м суткам отмечалось снижение данного показателя во всех группах. В 1-й контрольной Ki-67 составил $3,76 \pm 1,04\%$, во 2-й контрольной – ниже данного значения на 16,22%, в опытной – выше в 3,84 раза.

При оценке количества тучных клеток на единицу площади достоверных различий между 1-й контрольной и опытной группами выявлено не было (таблица 28). Увеличение количества тучных клеток на 5-е сутки в 1-й контрольной и опытной группах до 15,17 [7;21] усл. ед. и 17,67 [11;26] усл. ед., соответственно, свидетельствует о наличии воспалительных изменений в ткани печени, которые были купированы к 14-м суткам.

Таблица 28 – Количество тучных клеток в ткани печени на единицу площади, усл.ед.

Сутки после резекции	Группа исследования		
	1 контрольная	2 контрольная	Опытная
1	13,00 [2;38]	10,00 [1;31]	12,00 [3;30]
5	15,17 [7;21]	16,33 [7;30]	17,67 [11;26]
7	12,33 [4;27]	27,67 [3;54]	16,67 [3;26]
14	6,33 [1;20]	14,50 [3;50]	5,17 [0;14]

Следует отметить, что наибольшее количество тучных клеток наблюдалось во 2-й опытной группе, максимальный средний уровень показателя был зарегистрирован на 7-е сутки и составил 27,67 [3;54] усл. ед. (рисунок 26), что превышало значения 1-й контрольной группы в 2,24 раза (рисунок 25).

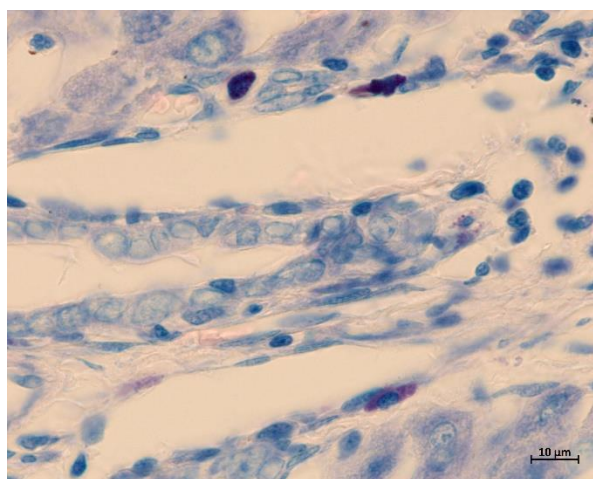


Рисунок 25 – 1 контрольная группа. Ткань печени с единичными тучными клетками. 7 сутки. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: окрашивание по Романовскому-Гимзе. x10

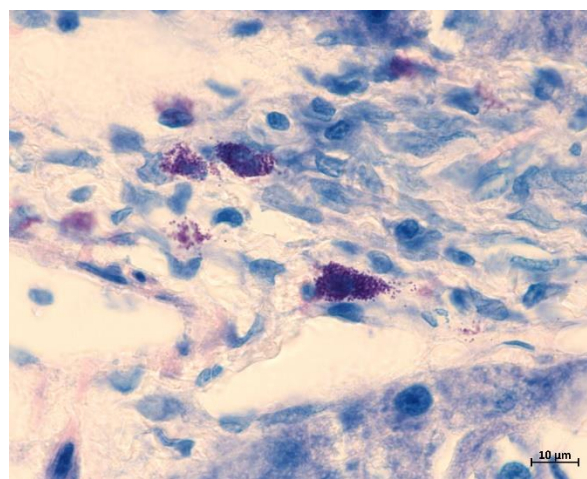


Рисунок 26 – 2 контрольная группа. Ткань печени с множественными тучными клетками. Увеличение количества тучных клеток в сравнении с 1-й контрольной группой. 7 сутки. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: окрашивание по Романовскому-Гимзе. x10

При оценке результатов морфологических и иммуногистохимических методов исследования было выявлено влияние внутрипеченочного введения цианокобаламина на повышение пролиферативной активности гепатоцитов,

при этом отсутствие фиброзных изменений в печени. В данной группе также отмечали наличие незначительных воспалительных изменений, купируемых к 14-м суткам эксперимента. Данные проведенных исследований демонстрируют негативное влияние внутрипеченочного введения адемeтионина на печеночную ткань, снижение количества митозов, развитие фиброзных, цирротических и воспалительных изменений печени.

Таким образом, исследования, проведенные во II блоке, демонстрируют, что при внутрипеченочном введении цианокобаламина наблюдается практически полная нормализация показателей синдромов цитолиза и холестаза, восстановление углеводного и жирового обменов, снижение окислительного стресса, повышение экспрессии факторов роста, пролиферативной активности гепатоцитов в 3,84 раза, что приводит к восстановлению до 95,27% от исходной массы печени к 14-м суткам после резекции. При внутрипеченочном введении адемeтионина выявлены значительные нарушения функции печени, которые не восстанавливались к 14-м суткам после резекции, снижение защитных антиоксидантных свойств, показателей IL-1 β и TGF- β 1, а также развитие фиброзных, цирротических и воспалительных изменений печени.

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СПОСОБА ИНТРАОПЕРАЦИОННОГО КОМБИНИРОВАННОГО ВВЕДЕНИЯ ЦИАНОКОБАЛАМИНА И АДЕМЕТИОНИНА ПОСЛЕ РЕЗЕКЦИИ ПЕЧЕНИ (III БЛОК ИССЛЕДОВАНИЯ)

5.1. Результаты объективных методов исследования

Объективные методы включали в себя оценку общего состояния, расчет полученной массы печени при выведении животных из эксперимента.

В течение первых суток у всех животных (n=72) отмечалось отсутствие аппетита, реакция только на сильные раздражители, общее состояние соответствовало 3 баллам по шкале, предложенной В.А. Липатовым и соавт. [35]. На 5-е сутки после резекции печени у 77,78% (n=18) животных контрольной группы (ТРП + внутрибрюшинное введение цианокобаламина и адеметионина) наблюдалась нормализация общего состояния, в опытной (ТРП + внутripеченочное введение цианокобаламина и внутрибрюшинное введение адеметионина) – у 100% (n=18). К 7-м суткам эксперимента у всех животных отмечали формирование окрепшего послеоперационного рубца, заживление послеоперационной раны, швы были сняты, общее состояние не отличалось от интактных животных (n=24). К 14-м суткам в области послеоперационной раны у всех животных (n=12) отмечалось практически полное восстановление покрова шерсти.

При выведении животных из эксперимента и макроскопической оценке печеночной ткани в контрольной и опытной группах изменений не было выявлено.

При оценке динамики восстановления массы печени наилучшие показатели наблюдались в опытной группе (таблица 29). На 1-е сутки после операции масса печени у всех животных составила не более 33,04% от

исходной*. На 5-е и 7-е сутки после резекции статистически значимых различий между группами зарегистрировано не было. На 14-е сутки после резекции масса печени в контрольной группе составила $11,60 \pm 0,76$ г (86,37% от исходной), в опытной – $12,83 \pm 0,10$ г (95,04% от исходной).

Таблица 29 – Динамика массы печени в группах исследования, г

Сутки после резекции	Группы исследования	
	Контрольная	Опытная
1	$4,45 \pm 0,39$	$4,65 \pm 0,29$
5	$7,57 \pm 1,49^2$	$6,27 \pm 0,30^2$
7	$9,73 \pm 1,12^2$	$8,05 \pm 1,13^2$
14	$11,60 \pm 0,76^2$	$12,83 \pm 0,10^{1, 2}$

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками ($p < 0,05$)

Таким образом, наиболее быстрая нормализация общего состояния наблюдалась в опытной группе – у 100% животных на 5-е сутки после резекции печени, что превышало показатели контрольной группы на 22,22%. При оценке восстановления исходной массы печени к 14-м суткам наилучшие показатели наблюдались в опытной группе – 95,04%, что превышало показатели контрольной группы на 8,67%.

5.2. Результаты лабораторных методов исследования (биохимических, иммуноферментных)

При проведении лабораторных исследований проводили оценку синдромов цитолиза, холестаза, печеночно-клеточной недостаточности, окислительного стресса, а также оценивали динамику факторов роста.

При изучении динамики показателей цитолитического синдрома – АСТ и АЛТ на 1-е сутки после операции наблюдали значительные отклонения от нормы у всех животных. Во всех группах показатели превышали нормальные значения более чем на 20%. К 5-м суткам после операции наблюдалось

* Расчет исходной массы печени выполнен по формуле (см. стр. 47)

снижение показателей синдрома цитолиза в контрольной и опытной группах: АЛТ в контрольной группе составил $96,50 \pm 6,72$ Ед/л, АСТ – $69,33 \pm 4,03$ Ед/л, в опытной – ниже на 12,26% и 14,90%, соответственно. На 7-е сутки после резекции печени нормализация показателей наблюдалась в опытной группе, в контрольной группе отмечали снижение АСТ и АЛТ в сравнении с 1-ми сутками на 32,25% и 24,18%, соответственно. На 14 сутки в контрольной группе отмечали нормализацию АЛТ, а АСТ превышал нормальные значения на 1,04% (таблица 30).

Таблица 30 – Динамика показателей цитолитического синдрома в группах исследования, Ед/л

Группа исследования	Показатели цитолитического синдрома	
	АЛТ	АСТ
1 сутки		
Контрольная	$100,67 \pm 10,17$	$97,67 \pm 13,60$
Опытная	$98,00 \pm 5,59$	$68,83 \pm 12,34^1$
5 сутки		
Контрольная	$96,50 \pm 6,72$	$69,33 \pm 4,03^2$
Опытная	$84,67 \pm 3,44^{1,2}$	$59,00 \pm 4,86^1$
7 сутки		
Контрольная	$76,33 \pm 10,37^2$	$66,17 \pm 4,22^2$
Опытная	$63,00 \pm 0,63^{1,2}$	$45,33 \pm 2,07^{1,2}$
14 сутки		
Контрольная	$63,17 \pm 0,98^2$	$48,5 \pm 3,02^2$
Опытная	$63,00 \pm 0,89^2$	$45,17 \pm 2,23^2$

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками ($p < 0,05$)

Таким образом, наибольшие показатели цитолиза были зарегистрированы в контрольной группе на 1-е сутки после резекции печени. Нормализация показателей отмечалась в опытной группе на 7-е сутки. На 14-е сутки в контрольной группе АЛТ приходил к норме, а АСТ превышал нормальные значения на 1,04%.

При оценке показателей холестатического синдрома на 1-е сутки после операции наблюдалось значительное повышение БЛ, ЩФ и ГГТП у всех животных. Показатели опытной группы на 1-е сутки незначительно отличались от данных контрольной группы. На 5-е сутки в контрольной и опытной группах наблюдалось снижение БЛ, ЩФ и ГГТП. В контрольной группе БЛ составил $1,57 \pm 0,21$ мкмоль/л, ЩФ – $187,33 \pm 2,72$ Ед/л, ГГТП – $9,77 \pm 0,55$ Ед/л, в опытной – ниже на 17,20%, 10,23% и выше на 2,15%, соответственно. Однако, следует отметить, что различия в сравнении с 1-ми сутками были статистически незначимы. На 7-е сутки после резекции печени была зарегистрирована нормализация ЩФ в опытной группе. На 7-е сутки после резекции печени отмечалось снижение ЩФ на 9,50 % в 1-й контрольной группе в сравнении с 1-ми сутками, к 14-м суткам нормализации данного показателя не отмечалось.

При оценке ГГТП на 7-е сутки данный показатель составил в контрольной группе – $9,40 \pm 0,447$ Ед/л, в опытной – ниже на 18,94%. На 14-е сутки исследования отмечали снижение ГГТП в контрольной группе на 18,36% в сравнении с 1-ми сутками, однако нормализации данного показателя не наблюдалось, в опытной группе данный показатель приходил к норме.

БЛ на 7-е сутки после резекции печени был значительно повышен в контрольной группе – $1,22 \pm 0,12$ мкмоль/л, в опытной – ниже на 16,39%, однако, статистически значимых различий между группами не отмечали. На 14-е сутки нормализации данного показателя не наблюдалось в контрольной группе, в опытной группе данный показатель приходил к норме.

ОХ с первых по 5-е сутки после операции был значительно ниже нормальных значений, во всех группах отмечалось повышение данного показателя в динамике с первых по 14-е сутки. На 7-е сутки в опытной группе была зарегистрирована нормализация ОХ – $1,89 \pm 0,06$ ммоль/л, в контрольной

группе ОХ был ниже на 33,10%. К 14-м суткам отмечали нормализацию ОХ в контрольной группе (таблица 31).

Таблица 31 – Динамика показателей холестатического синдрома в группах исследования

Показатель / Группа	БЛ, мкмоль/л	ЩФ, ЕД/л	ГГТП, ЕД/л	ОХ, ммоль/л
1 сутки				
Контрольная	1,62±0,16	179,83±13,04	10,13±0,21	1,38±0,08
Опытная	1,28±0,12	182,50±10,93	10,73±1,71	1,50±0,09
5 сутки				
Контрольная	1,57±0,21	187,33±2,72	9,77±0,55	1,35±0,15
Опытная	1,30±0,11	168,17±4,71 ¹	9,98±0,35	1,55±0,14 ¹
7 сутки				
Контрольная	1,22±0,12 ²	162,83±9,28 ²	9,40±0,44	1,42±0,15
Опытная	1,02±0,13 ²	136,83±4,45 ^{1, 2}	7,62±0,41 ^{1, 2}	1,89±0,06 ^{1, 2}
14 сутки				
Контрольная	1,05±0,10 ²	145,00±4,60 ²	8,27±0,20 ²	1,87±0,08 ²
Опытная	0,90±0 ²	139,00±2,00 ²	7,42±0,28 ^{1, 2}	1,88±0,05 ²

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с контрольной группой (p<0,05), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками (p<0,05)

Таким образом, нормальные показатели холестатического синдрома после резекции печени были зарегистрированы только в опытной группе: ЩФ, ГГТП, ОХ – на 7-е сутки, БЛ - на 14-е сутки. Нормализации показателей к 14-м суткам в контрольной группе не отмечали, за исключением ОХ.

При оценке показателей синдрома печеночно-клеточной недостаточности наблюдалось значительное снижение белково-синтетической функции печени у всех животных, что подтверждалось показателями общего белка. На 1-е сутки после резекции печени ОБ в контрольной группе составил 46,83±3,31 г/л, в опытной – 48,67±3,01 г/л. На 5-е сутки в группах отмечали повышение данного показателя, однако статистически значимых различий в сравнении с 1-ми сутками не отмечали. На 7-е сутки ОБ повышался в контрольной группе

на 9,97%, в опытной – на 14,71%, в сравнении с 1-ми сутками. К 14-м суткам после резекции наблюдали нормализацию данного показателя в опытной группе, в контрольной – был снижен на 11,51%.

Глюкоза крови была повышена с первых по 14-е сутки эксперимента в контрольной группе (таблица 32), нормализации данного показателя не регистрировали. В опытной группе к 7-м суткам наблюдали нормализацию показателя.

Таблица 32 – Динамика глюкозы в группах исследования, ммоль/л

Сутки после операции	Группы исследования	
	Контрольная	Опытная
1	10,62±0,28	10,35±0,39
5	10,88±0,36	10,63±0,31
7	9,93±0,34 ²	8,62±0,26 ^{1,2}
14	9,65±0,23 ²	8,38±0,27 ^{1,2}

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с контрольной группой ($p<0,05$), ² - достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками ($p<0,05$)

При оценке показателей азотистого обмена на 1-е сутки после резекции печени МЧ и КР у всех животных были повышены. На 5-е сутки в контрольной группе МЧ составила 8,53±0,27 ммоль/л, КР – 45,33±2,80 мкмоль/л, в опытной – 8,20±0,14 ммоль/л и 42,00±2,61 мкмоль/л, соответственно. К 7-м суткам МЧ в контрольной группе снижалась на 4,71%, в опытной – на 6,10% в сравнении с 1-ми сутками. К 14-м суткам данный показатель нормализовался в обеих группах. КР на 7-е сутки в опытной группе соответствовал нормальным значениям, в контрольной – превышал их на 5,71%. На 14-е сутки отмечалась нормализация изучаемого показателя у всех животных.

Таким образом, при оценке показателей синдрома печеночно-клеточной недостаточности наблюдалось снижение белково-синтетической функции печени и нарушение углеводного и азотистого обменов у всех животных после резекции печени. В опытной группе на 7-е сутки отмечали нормализацию ГЛ

и МЧ, на 14-е – ОБ и КР, в контрольной группе – только МЧ и КР на 14-е сутки после операции.

При анализе липидного профиля на 1-е сутки после операции статистически значимых различий между группами не наблюдалось (таблица 33).

Таблица 33 – Динамика показателей липидного профиля, ммоль/л

Группа исследования	Показатели липидного профиля				
	ТГ, ммоль/л	ЛПВП, ммоль/л	ЛПНП, ммоль/л	ЛПОНП, ммоль/л	КАГ
1 сутки					
Контрольная	0,037 ±0,008	0,045 ±0,001	1,322 ±0,076	0,017 ±0,003	1,400 ±0,165
Опытная	0,037 ±0,008	0,042 ±0,010	1,442 ±0,094	0,017 ±0,003	1,423 ±0,172
5 сутки					
Контрольная	0,048 ±0,008	0,007 ±0,009 ²	1,258 ±0,554	0,022 ±0,005	1,322 ±0,084
Опытная	0,057 ±0,020	0,840 ±0,061 ^{1,2}	0,452 ±0,152 ^{1,2}	0,258 ±0,089 ^{1,2}	1,311 ±0,118
7 сутки					
Контрольная	0,055 ±0,010 ²	0,217 ±0,133 ^{2,2}	1,175 ±0,209	0,025 ±0,005	1,160 ±0,681
Опытная	0,9±0 ^{1,2}	1,111 ±0,016 ^{1,2}	0,368 ±0,068 ^{1,2}	0,410±0 ^{1,2}	1,368 ±0,005
14 сутки					
Контрольная	0,075 ±0,012 ²	0,667 ±0,216 ²	1,166 ±0,252	0,034 ±0,006 ²	1,058 ±0,027 ²
Опытная	0,710 ±0,033 ^{1,2}	1,161 ±0,044 ^{1,2}	0,397 ±0,151 ^{1,2}	0,323 ±0,149 ^{1,2}	1,276 ±0,130 ¹

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с контрольной группой (p<0,05), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками (p<0,05)

На 5-е сутки отмечали выраженное нарушение жирового обмена, ТГ, ЛПВП были значительно ниже нормы, ЛПНП завышены. На 7-е сутки эксперимента в опытной группе наблюдалась нормализация ТГ, ЛПВП и ЛПНП, а ЛПОНП были выше нормы в 2,38 раза; в контрольной группе ТГ и ЛПВП были снижены, ЛПНП – завышены более чем в 3 раза, ЛПОНП – не превышали нормальные значения. На 14-е сутки отмечалась аналогичная

картина, за исключением нормализации ЛПОНП в опытной группе. КАГ на протяжении всего эксперимента был значительно выше нормальных показателей.

Таким образом, при оценке липидного профиля нормализация более чем 50% показателей наблюдалась только в опытной группе к 7-м суткам после резекции печени, в контрольной группе только ЛПОНП приходили к нормальным значениям. Следует отметить повышение коэффициента атерогенности у всех животных, что подтверждает дисбаланс липидного обмена в послеоперационном периоде.

Для оценки оксидативного стресса проводили определение активности систем антиоксидантной защиты – ГП, ГР, СОД, GSH и продуктов перекисного окисления – МДА, ДНФГ-производные (таблица 34).

Таблица 34 – Динамика показателей систем антиоксидантной защиты

Группа исследования	Показатели системы антиоксидантной защиты			
	ГП, Е/мл	ГР, Е/мл	СОД, Ед/мл	GSH, мг%
1 сутки				
Контрольная	0,170±0,009	0,016±0,002	0,393±0,029	84,622±3,690
Опытная	0,183±0,011 ¹	0,024±0,002 ¹	0,563±0,078 ¹	86,805±3,670
5 сутки				
Контрольная	0,204±0,010 ²	0,035±0,005 ²	0,429±0,030	84,147±3,986
Опытная	0,211±0,005 ²	0,040±0,006 ²	0,599±0,051 ¹	88,317±5,228
7 сутки				
Контрольная	0,184±0,006	0,031±0,004 ²	0,483±0,037 ²	102,995±5,740 ²
Опытная	0,291±0,020 ²	0,046±0,004 ^{1,2}	0,619±0,067 ¹	110,830±3,251 ²
14 сутки				
Контрольная	0,177±0,011	0,018±0,003	0,466±0,028 ²	77,792±4,932
Опытная	0,217±0,024 ¹	0,027±0,003	0,516±0,051	86,267±3,508 ¹

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с контрольной группой (p<0,05), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками (p<0,05)

В группах исследования наблюдалась сходная динамика показателей – повышение активности систем антиоксидантной защиты на 5-е и 7-е сутки исследования. Наибольшая активность ферментативной системы защиты была отмечена в опытной группе: на 7-е сутки – ГП - 0,291±0,020 Е/мл, ГР -

0,046±0,004 Е/мл, СОД - 0,619±0,067 Ед/мл, в контрольной группе показатели были ниже на 58,15%, 48,39% и 28,15%, соответственно. Максимальная активность неферментативной системы так же была зарегистрирована в опытной группе на 7-е сутки после резекции печени GSH составили 110,830±3,251 мг%, в контрольной группе – ниже на 7,61%.

При оценке динамики МДА и ДНФГ отмечалось повышение показателей в обеих группах исследования на 1-е сутки, МДА в контрольной группе составил 21,45±2,81 нмоль/л, в опытной – ниже на 24,29%. При оценке ДНФГ статистически значимых различий между группами выявлено не было. С 1-х по 14-е сутки исследования количество продуктов окисления снижалось в обеих группах. Минимальные показатели были зарегистрированы на 14-е сутки: в контрольной группе МДА – 13,67±2,63 нмоль/л, ДНФГ – 2,03±0,10 Ед/г белка, в опытной – ниже на 33,28% и 71,43%, соответственно (таблица 35).

Таблица 35 – Динамика показателей перекисного окисления липидов в группах исследования

Сутки после резекции	Группа исследования	
	Контрольная	Опытная
МДА, нмоль/л		
1	21,45±2,81	16,24±3,83 ¹
5	21,76±4,11	14,85±2,37 ¹
7	19,15±1,88	13,22±3,30 ¹
14	13,67±2,63 ²	9,12±1,82 ^{1,2}
ДНФГ, Ед/г белка		
1	2,39±0,09	2,24±0,10
5	2,19±0,04 ²	1,59±0,46 ^{1,2}
7	2,07±0,14 ²	1,35±0,13 ^{1,2}
14	2,03±0,10 ²	0,58±0,33 ^{1,2}

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с контрольной группой (p<0,05), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками (p<0,05)

Таким образом при оценке активности систем антиоксидантной защиты и динамики продуктов окисления, наибольшая активность

ферментативной и не ферментативной систем защиты отмечалась на 5-е сутки после резекции печени в опытной группе, что привело к значительному снижению количества продуктов окисления. На 14-е сутки эксперимента МДА и ДНФГ в опытной группе были ниже на 33,28% и 71,43%, в сравнении с контрольной группой.

При оценке стимуляции экспрессии первичных и вторичных митогенов на 1-е сутки статистически значимых различий при оценке IL-1 β не отмечали, TGF- β 1 в опытной группе превышал значения контрольной на 89,83%. Максимальные показатели IL-1 β были зарегистрированы на 5-е сутки в контрольной группе – 52,46 [48,15;58,23] пг/мл, на 7-е сутки в опытной – 80,17 [71,45;88,26] пг/мл. Пик TGF- β 1 отмечали на 7-е сутки: в контрольной группе - 3146,50 [2651;3741] пг/мл, в опытной данный показатель был выше на 31,52%. К 14-м суткам отмечалось снижение IL-1 β и TGF- β 1 у всех животных, статистически значимых различий между контрольной и опытной группами не выявили (таблица 36).

Таблица 36 – Динамика экспрессии факторов роста в группах исследования, пг/мл

Показатель	Группа исследования	
	Контрольная	Опытная
1 сутки		
IL-1 β	37,07 [31,24;41,65]	34,57 [30,25;40,12]
TGF- β 1	1854,67 [1245;2205]	3520,67 ¹ [2945;4102]
5 сутки		
IL-1 β	52,46 ² [48,15;58,23]	62,95 ^{1,2} [58,25;70,15]
TGF- β 1	2992,17 ² [2658;3259]	3807,00 ¹ [3221;4324]
7 сутки		
IL-1 β	38,46 ² [32,15;45,68]	80,17 ^{1,2} [71,45;88,26]
TGF- β 1	3146,50 ² [2651;3741]	4138,17 ¹ [3658;4780]
14 сутки		
IL-1 β	25,31 [20,15;30,45]	23,05 [20,56;25,12]
TGF- β 1	1317,17 ² [1105;1452]	1385,17 ² [1203;1745]

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с контрольной группой (p<0,05), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками (p<0,05)

Таким образом, оценка динамики показателей экспрессии факторов роста демонстрирует значительное повышение IL-1 β и TGF- β 1 в опытной группе, на 5-е сутки показатели IL-1 β и TGF- β 1 превышали значения контрольной группы на 20,00% и 27,23%, на 7-е сутки на 108,45% и 31,52%, соответственно.

При оценке лабораторных показателей в опытной группе на 7-е сутки после резекции печени наблюдалась нормализация показателей цитолитического, холестатического синдромов, синдрома печеночно-клеточной недостаточности, в контрольной группе к 14-м сутками отмечали нормализацию только АСТ, АЛТ, МЧ и КР. В опытной группе наблюдалась активация систем антиоксидантной защиты, что способствовало снижению продуктов окисления МДА на 33,28%, ДНФГ – на 71,43%, в сравнении с контрольной группой. Оценка динамики показателей экспрессии факторов роста демонстрировала значительное повышение IL-1 β и TGF- β 1 в опытной группе, на 5-е сутки показатели IL-1 β и TGF- β 1 превышали значения контрольной группы на 20,00% и 27,23%, на 7-е сутки на 108,45% и 31,52%, соответственно.

5.3. Результаты морфологических методов исследования (гистологических, иммуногистохимических)

При проведении гистологического и иммуногистохимического исследований была проведена оценка количества двуядерных гепатоцитов в ткани печени, наличия фиброзных и воспалительных изменений, расчет индекса пролиферативной активности гепатоцитов.

Для оценки количества и соотношения одноядерных и двуядерных гепатоцитов проведено изучение срезов печени, окрашенных гематоксилином и эозином. В группах исследования отмечалась сходная тенденция – увеличение количества двуядерных гепатоцитов с первых по 14-е сутки эксперимента на единицу площади (таблица 37).

Таблица 37 – Количество двуядерных гепатоцитов в ткани печени на единицу площади, усл. ед.

Сутки после резекции	Группа исследования	
	Контрольная	Опытная
1	137,00 [115;158]	167,33 [121;195]
5	219,50 ² [168;327]	242,17 ² [198;274]
7	312,33 ² [239;393]	367,00 ² [304;392]
14	400,83 ² [373;417]	1086,17 ^{1,2} [375;563]

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$), ² – достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками ($p < 0,05$)

На 1-е сутки после резекции печени статистически значимых различий в группах выявлено не было. На 5-е сутки показатель в опытной группе был выше на 10,33%, на 7-е – на 17,50%. Максимальные значения были зарегистрированы на 14-е сутки: в контрольной группе – 400,83 [373;417] усл. ед. (рисунок 27), в опытной – 1086,17 [375;563] усл. ед. (рисунок 28).

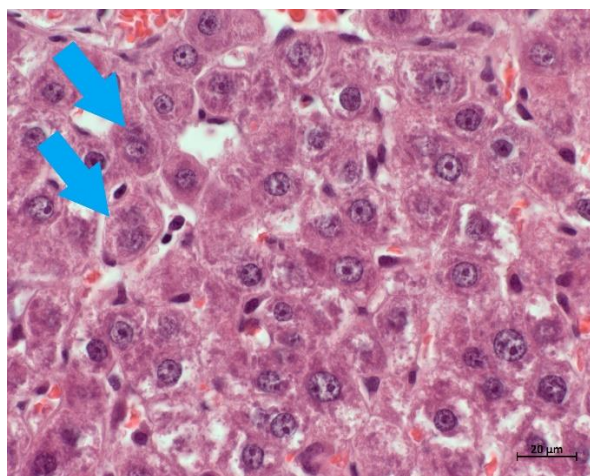


Рисунок 27 – Контрольная группа. Ткань печени. Стрелками отмечены двуядерные гепатоциты, расположенные в ткани печени хаотично. 14 сутки. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: окрашивание гематоксилином и эозином. x20

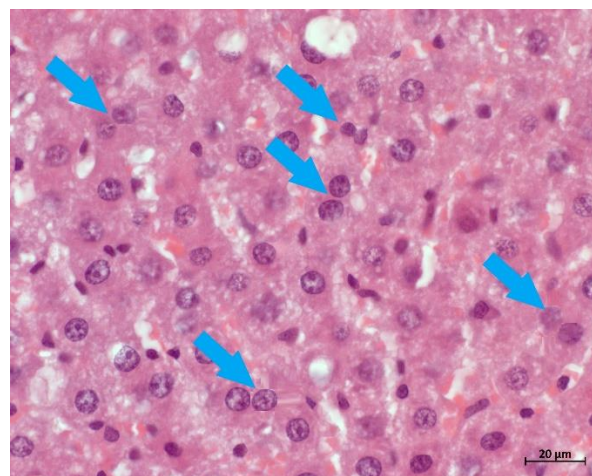


Рисунок 28 – Опытная группа. Ткань печени. Стрелками отмечены двуядерные гепатоциты, увеличение их количества в сравнении с контрольной группой 14 сутки. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: окрашивание гематоксилином и эозином. x20

В обеих группах исследования двуядерные гепатоциты располагались хаотично, специфической локализации относительно триад и печеночных

долек выявлено не было. Двухъядерные гепатоциты характеризовались увеличением размера и объема цитоплазмы в сравнении с одноядерными.

Идентификацию ретикулярных волокон в строме печени выполняли с помощью гистохимических протоколов (импрегнация серебром). При оценке количества и характеристик ретикулярных волокон в строме печени статистически значимых различий между группами выявлено не было (таблица 38).

Таблица 38 – Количество ретикулярных волокон в ткани печени на единицу площади, усл. ед.

Сутки после резекции	Группа исследования	
	Контрольная	Опытная
1	4137,00 ¹ [4061;4203]	4234,83 [4151;4325]
5	5329,17 [5252;5359]	5354,00 ¹ [5248;5478]
7	5366,50 ¹ [5295;5433]	5338,17 ¹ [5268;5394]
14	5818,17 ¹ [5720;5940]	6105,33 ¹ [5700;7667]

Примечания: ¹ - достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками после резекции (p<0,05)

Отмечалось увеличение количества ретикулярных волокон с первых по 14-е сутки исследования, наибольшие показатели были зарегистрированы на 14-е сутки после резекции печени: в контрольной – 5818,17 [5720;5940] усл. ед., в опытной – выше на 4,96%, однако выявленные различия были статистически незначимы. Расположение и толщина ретикулярных волокон было типично для строения печеночной ткани, в контрольной и опытной группах не имели достоверных различий, уплотнения ретикулярной сети отсутствовали (рисунок 29, 30).

С целью выявления изменений качества и количества коллагеновых волокон при окраске по Массону-Голднеру оценивали расположение, размер и количество коллагеновых волокон в строме печени. Изменения структуры печеночной ткани не было выявлено в контрольной и опытной группах. Параметры и расположение коллагеновых волокон в опытной группе были идентичны и сравнимы с контрольной (рисунок 31).

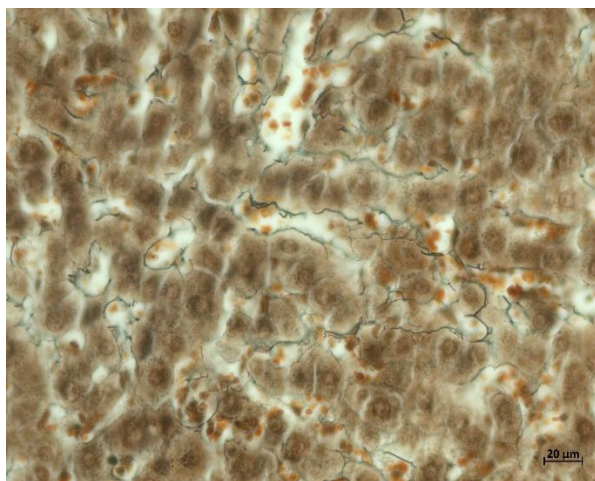


Рисунок 29 – Контрольная группа. Ретикулярные волокна печени. Расположение и толщина ретикулярных волокон типична для строения печеночной ткани. 14 сутки. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: импрегнация серебром. x20

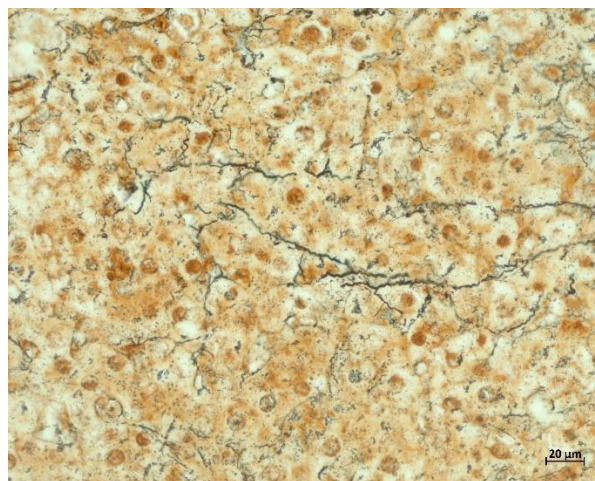


Рисунок 30 – Опытная группа. Ретикулярные волокна печени. Статистически значимые различия в сравнении с контрольной группой отсутствуют. 14 сутки. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: импрегнация серебром. x20

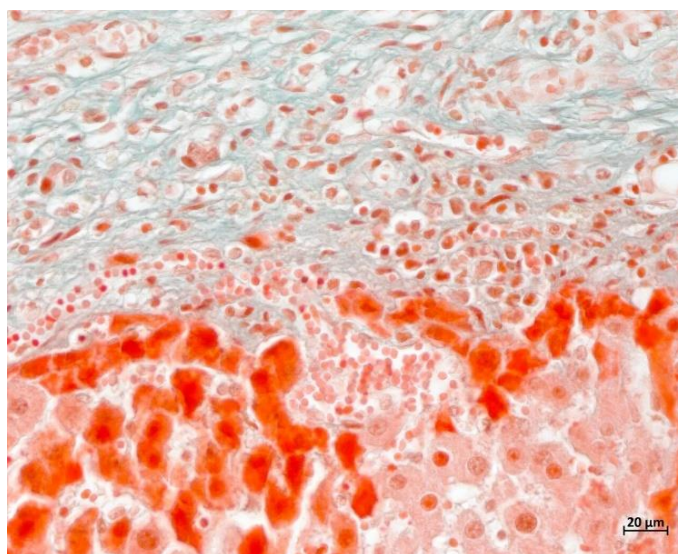


Рисунок 31 – Контрольная группа. Коллагеновые волокна печени. Толщина и расположение коллагеновых волокон типично для печеночной ткани, периваскулярный фиброз отсутствует. 14 сутки. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: окрашивание по Массону-Голднеру. x20

При оценке индекса пролиферации гепатоцитов Ki-67 отмечали повышение данного показателя в контрольной и опытной группах с первых по 7-е сутки после резекции (таблица 39).

Таблица 39 – Количество Ki-67-позитивных ядер гепатоцитов в ткани печени, %

Сутки после резекции	Группа исследования	
	Контрольная	Опытная
1	2,02±0,17	7,91±2,78 ¹
5	6,24±0,70 ²	15,79±0,75 ^{1, 2}
7	10,14±2,00 ²	17,12±3,13 ^{1, 2}
14	8,21±1,61 ²	13,08±6,62

Примечания: ¹ – достоверность различий в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$), ² - достоверность различий в сравнении с 1-ми сутками ($p < 0,05$)

На 1-е сутки в контрольной группе количество Ki-67-позитивных ядер гепатоцитов составило – 2,02±0,17%, в опытной – выше в 3,92 раза. На 5-е сутки наблюдалась аналогичная тенденция – Ki-67 в опытной группе превышал значения контрольной в 2,53 раза. Наибольшие показатели были зарегистрированы на 7-е сутки: контрольная группа – 10,14±2,00% (рисунок 32), опытная – выше на 68,84% (рисунок 33).

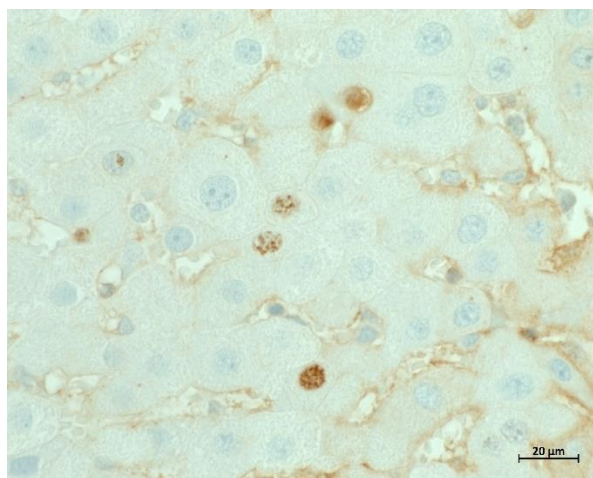


Рисунок 32 – Контрольная группа. Ткань печени с Ki-67-позитивными ядрами гепатоцитов. 7 сутки. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: иммуногистохимическое окрашивание белка Ki-67, x20

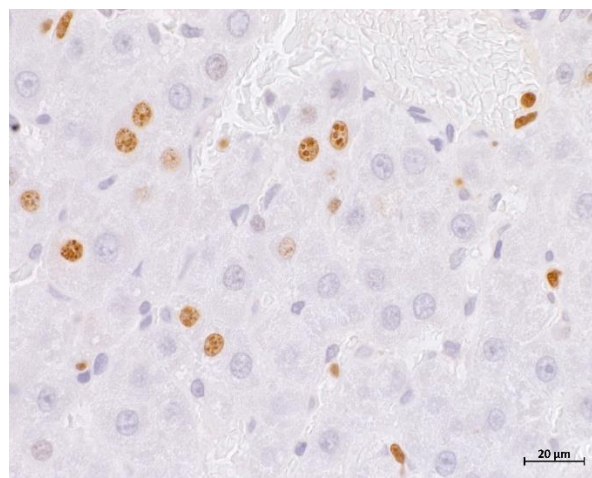


Рисунок 33 – Опытная группа. Ткань печени с Ki-67-позитивными ядрами гепатоцитов, увеличение их количества в сравнении с контрольной группой. 7 сутки. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: иммуногистохимическое окрашивание белка Ki-67, x20

К 14-м суткам после резекции отмечали снижение индекса пролиферации, статистически значимых различий между группами исследования не наблюдали.

Все Ki-67-позитивные ядра гепатоцитов имелись в одноядерных клетках, что сопровождалось увеличением объема цитоплазмы гепатоцитов и появлением окрашенных ядрышек клетки. Двухядерные гепатоциты с Ki-67-позитивными ядрами не встречались. Расположение клеток с Ki-67-позитивной реакцией было хаотичным, специфической ориентации относительно печеночных долек не наблюдалось.

При оценке количества тучных клеток на единицу площади достоверных различий между группами выявлено не было (таблица 40).

Таблица 40 – Количество тучных клеток в ткани печени на единицу площади, усл. ед.

Сутки после резекции	Группа исследования	
	Контрольная	Опытная
1	13,00 [4;23]	11,17 [0;33]
5	12,17 [6;23]	11,83 [1;21]
7	9,83 [7;16]	6,83 [2;19]
14	4,67 [1;7]	4,50 [2;9]

Увеличение количества тучных клеток на 1-е и 5-е сутки в контрольной и опытной группах до 13,00 [4;23] усл. ед. (рисунок 34) и 12,17 [6;23] усл. ед., а также до 11,17 [0;33] усл. ед. (рисунок 35) и 11,83 [1;21] усл. ед., соответственно, свидетельствует о наличии воспалительных изменений в ткани печени, которые были купированы к 14-м суткам.

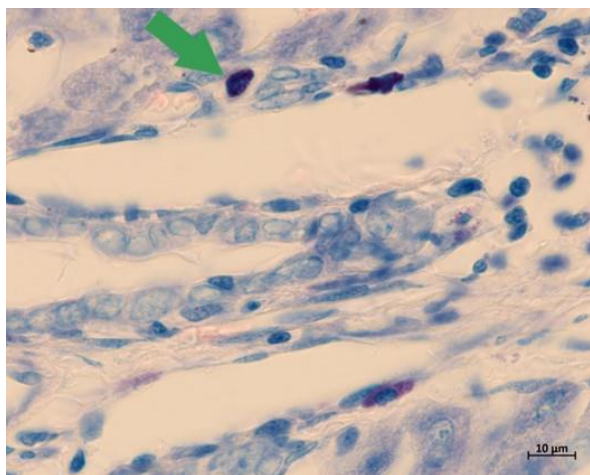


Рисунок 34 – Контрольная группа. Ткань печени. Стрелкой отмечены тучные клетки. Периваскулярное расположение тучных клеток. 1 сутки. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: окрашивание по Романовскому-Гимзе. x10

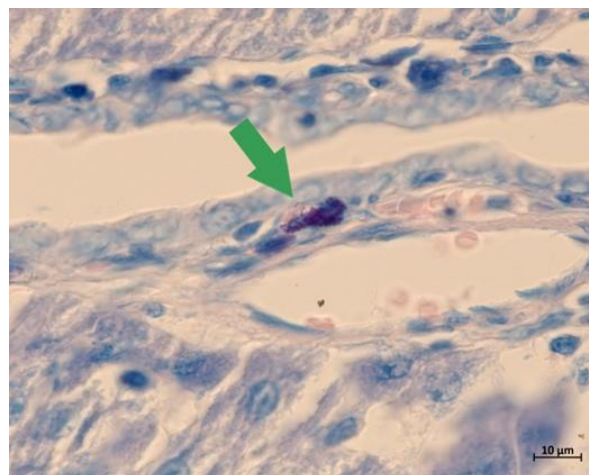


Рисунок 35 – Опытная группа. Ткань печени. Стрелкой отмечены тучные клетки. Периваскулярное расположение тучных клеток. Статистически значимые различия в сравнении с контрольной группой отсутствуют. 1 сутки. Фиксация: 10% нейтральный формалин. Методика: окрашивание по Романовскому-Гимзе. x10

Расположение тучных клеток в группах исследования было идентично: чаще всего они встречались периваскулярно, что также может быть связано с изменением кровотока после резекции печени.

При оценке результатов морфологических и иммуногистохимических методов исследования было выявлено влияние внутрипеченочного введения цианокобаламина дополненное внутрибрюшинным применением адеметионина на повышение пролиферативной активности гепатоцитов более чем в 2 раза, при этом отсутствие фиброзных и воспалительных изменений в печени.

Таким образом, исследования, проведенные в III блоке, демонстрируют что внутрипеченочное введение цианокобаламина дополненное внутрибрюшинным введением адеметионина на 7-е сутки после резекции печени способствует нормализации показателей цитолитического,

холестатического синдромов, синдрома печеночно-клеточной недостаточности, активации систем антиоксидантной защиты, снижению продуктов окисления, повышению IL-1 β на 108,45% и TGF- β 1 на 31,23%, в сравнении с контрольной группой. Также следует отметить, что при применении разработанного способа наблюдается повышение пролиферативной активности гепатоцитов на 68,84%, что приводит к восстановлению 95,04% от исходной массы печени к 14 суткам после резекции, при отсутствии фиброзных и воспалительных изменений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хирургическое лечение пациентов с очаговыми образованиями и травмами печени является актуальной проблемой гепатобилиарной хирургии, так как резекция печени, в большинстве случаев, остается единственным способом, позволяющим добиться излечения пациентов и улучшить отдаленные результаты [46, 72, 80, 93]. Следует отметить, что выживаемость больных с новообразованиями и травмами печени напрямую связана с регенераторным потенциалом печеночной ткани, скоростью восстановления анатомической и функциональной целостности печени после резекции [51]. Несмотря на широкое применение миниинвазивных эндовидеолапароскопических и рентгенэндоваскулярных хирургических технологий, основным, и наиболее распространенным, методом лечения является резекция печени [36, 89]. В связи с особенностями топографии печени, сложностью обеспечения полноценного видеолапароскопического доступа к отдельным ее сегментам, основой хирургической гепатологии продолжают оставаться открытые вмешательства [75, 88].

Высокая летальность после обширных резекций печени чаще связана с кровопотерей, а также интоксикацией, обусловленной печеночной недостаточностью [88, 102]. Кроме того, функциональное состояние печеночной ткани в предоперационном периоде, наличие хронических заболеваний печени также оказывают значительное влияние на сроки репаративной регенерации и реабилитации пациентов [36, 89]. На сегодняшний день пострезекционная печеночная недостаточность, по данным литературы, встречается в 32–60% наблюдений и риск ее развития связан с несколькими факторами [12, 80, 81, 97]. Прежде всего, это дисфункция паренхимы печени, которая может быть обусловлена исходными дистрофическими или цирротическими изменениями, гипоксией циркуляторного, гемического или смешанного характера, недостаточным

оставшимся объемом печеночной ткани, повреждением желчных протоков [14, 59, 102].

Таким образом, на современном этапе развития медицины, поиск новых методов стимуляции репаративной регенерации печени остается актуальной задачей хирургии, решение которой позволит сократить сроки восстановления печеночной ткани, снизить риск развития послеоперационной печеночной недостаточности, сократить сроки реабилитации и госпитализации после обширных резекций.

Цель исследования – повышение эффективности пострезекционной регенерации печени интраоперационными внутripеченочным и внутривбрюшинным введениями цианокобаламина и адеметионина в эксперименте.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи исследования: разработать способ стимуляции пострезекционной регенерации печени, основанный на интраоперационных внутripеченочном и внутривбрюшинном введениях цианокобаламина и адеметионина, и устройство для его осуществления; изучить влияние внутривбрюшинных введений цианокобаламина и адеметионина на течение послеоперационного периода, динамику восстановления массы печени, лабораторных показателей, в т.ч. окислительного стресса, экспрессии факторов роста TGF- β 1 и IL-1 β , морфологические характеристики ткани печени; исследовать влияние внутripеченочного введения цианокобаламина и адеметионина на восстановление массы печени, ее функциональной активности, лабораторные показатели, в т.ч. окислительного стресса, факторы роста TGF- β 1 и IL-1 β , пролиферативную активность гепатоцитов, развитие фиброзных и воспалительных изменений; оценить эффективность способа внутripеченочного введения цианокобаламина дополненного внутривбрюшинным применением адеметионина, его воздействие на динамику синдромов цитолиза, холестаза, печеночно-клеточной

недостаточности, окислительного стресса, экспрессии факторов роста TGF- β 1 и IL-1 β , морфологические характеристики ткани печени.

Работа представляет собой проспективное рандомизированное исследование, выполненное на базе Научно-исследовательского института экспериментальной биологии и медицины Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко.

Эксперименты выполнены на 192 половозрелых самцах крыс линии Wistar, которым выполняли типичную резекцию печени ~ 70% исходного объема печени, согласно модели предложенной G. Higgins и R. Anderson. Проведены три блока исследований.

В I блоке исследования изучали влияние внутрибрюшинного введения адеметионина и цианокобаламина на пострезекционную регенерацию печени. Выделены две контрольные и одна опытная группы. В 1-й контрольной группе стимуляцию пролиферации гепатоцитов не осуществляли; во 2-й контрольной – после резекции печени вводили адеметионин (конц. 400 мг/мл) внутрибрюшинно в объеме 1 мл; в опытной – цианокобаламин 1 мл (конц. 500 мкг/мл).

Во II блоке исследования изучали влияние интраоперационных внутripеченочных инъекций и внутripеченочного введения препаратов на пострезекционную регенерацию печени. Выделены две контрольные и одна опытная группы. В 1-й контрольной группе в сохраненные доли печени интраоперационно внутripеченочно вводили 0,9% раствор хлорида натрия в объеме 1 мл; во 2-й контрольной – адеметионин (конц. 400 мг/мл); в опытной – цианокобаламин (конц. 500 мкг/мл).

В III блоке исследования изучали комбинированное применение адеметионина и цианокобаламина, и их влияние на пострезекционную регенерацию печени. Выделены две группы исследования: контрольная и опытная. В контрольной группе адеметионин и цианокобаламин вводили внутрибрюшинно по 0,5 мл, в опытной – внутripеченочное введение 0,5 мл

цианокобаламина дополняли внутривенным введением 0,5 мл адеметионина.

Животных выводили из эксперимента на 1, 5, 7 и 14-е сутки после резекции печени, выполняли гепатэктомию, проводили забор крови.

Для оценки репаративных процессов применяли объективные, лабораторные, гистологические и иммуногистохимические методы исследования. Объективные методы включали в себя оценку общего состояния животных на основании шкалы, предложенной В.А. Липатовым и соавт. [35], динамики массы печени по формуле: $M_{исх} = M_{рез} * 3/2$.

Биохимические методы исследования включали в себя оценку синдромов цитолиза, холестаза, печено-клеточной недостаточности, анализ липидного профиля. Для оценки оксидативного стресса определяли активность систем антиоксидантной защиты и продуктов перекисного окисления. Также проводили оценку динамики факторов роста IL-1 β и TGF- β 1.

Морфологический анализ включал в себя: изучение структуры срезов печеночной ткани, окрашенных гематоксилином и эозином; идентификацию ретикулярных и коллагеновых волокон в строме печени, с помощью гистохимических протоколов (окрашивание по Массону-Голднеру, импрегнация серебром); идентификацию тучных клеток в срезах печени, окрашенных по Романовскому-Гимзе. Иммуногистохимическое исследование выполняли путем оценки индекса пролиферации гепатоцитов с помощью иммуноморфологической детекции белка Ki-67.

Для статистической обработки данных был использован пакет программ STATGRAPHICS Centurion 18, версия 18.1.12 (Statgraphics Technologies, Inc., США). Статистическая обработка полученных результатов проводилась путем дисперсионного анализа (ANOVA). В качестве основного инструмента дисперсионного анализа применялся F-тест, который рассчитывался как отношение межгрупповой дисперсии к внутригрупповой

дисперсии и показывал, насколько значимы различия между группами. Для определения статистической значимости различий между дисперсиями использовали таблицу распределения Фишера-Снедекора. Определяли значение критической F-статистики для выбранных уровней значимости ($p = 0,05$) и степеней свободы.

В I блоке исследования на 5-е сутки после резекции печени нормализация общего состояния лабораторных животных наблюдалась при внутрибрюшинном введении адеметионина (2-я контрольная группа) – у 77,8%, что превышало показатели 1-й контрольной группы (стимуляция регенерации печени не проводилась) на 27,8%, опытной – на 5,6%. Однако, наибольший процент восстановления массы печени был зарегистрирован при внутрибрюшинном введении цианокобаламина (опытная группа) – 85,26%, что превышало показатели 1-й контрольной группы на 9,61%, 2-й контрольной – на 3,46%. При этом, следует отметить, что различия изучаемого показателя между 2-й контрольной и опытной группами были статистически недостоверны.

При изучении динамики цитолитического синдрома к 14-м суткам было отмечено, что нормализация показателей у всех животных отмечалась только во 2-й контрольной группе. Максимальные показатели холестатического синдрома были зарегистрированы на 1-е сутки после резекции печени. Наибольшие значения ЩФ, ГГТП и ОХ отмечались в 1-й контрольной группе, БЛ – во 2-й контрольной и опытной группах. На 5-е и 7-е сутки статистически значимых различий между группами выявлено не было. На 14-е сутки после операции нормализация БЛ наблюдалась только в опытной группе, ГГТП и ОХ – только во 2-й контрольной группе. Нормализации ЩФ в группах исследования зарегистрировано не было. При оценке показателей синдрома печеночно-клеточной недостаточности наблюдалось значительное снижение белково-синтетической функции печени, нарушение углеводного и азотистого обменов у всех животных, к 14-

м суткам нормализации показателей не отмечали, исключение составили уровень КР и МЧ в опытной группе. На 14-е сутки наибольшие значения ОБ зарегистрированы во 2-й контрольной группе. При анализе липидного профиля отмечали нарушение жирового обмена с первых по 7-е сутки после резекции печени, при этом статистически значимые различия наблюдались только на 1-е сутки при сравнении данных опытной и 1-й контрольной групп. К 14-м суткам эксперимента показатели нормализовались у всех животных.

При оценке активности систем антиоксидантной защиты и динамики уровня продуктов окисления наибольшая активность ферментативной системы защиты отмечалась на 5-е и 7-е сутки после резекции печени во 2-й контрольной группе, при этом наблюдали значительное снижение ДНФГ.

При оценке динамики экспрессии факторов роста максимальные значения IL-1 β были выявлены на 5-е сутки, TGF- β 1 – на 7-е сутки после резекции печени при внутрибрюшинном введении цианокобаламина.

При оценке результатов морфологических и иммуногистохимических методов в I блоке исследования было выявлено отсутствие выраженного влияния внутрибрюшинного введения адеметионина и цианокобаламина на вступление малоактивных клеток в митотический цикл, отсутствие фиброзных и воспалительных изменений в ткани печени, что подтверждалось недостоверными различиями между группами при подсчете количества двуядерных гепатоцитов, ретикулярных и коллагеновых волокон, тучных клеток.

Таким образом, исследования, проведенные в I блоке, демонстрируют преимущественное влияние внутрибрюшинного введения адеметионина на восстановление функциональной активности печени, что сопровождается снижением показателей синдромов цитолиза, холестаза, окислительного стресса, частичным восстановлением белково-синтетической функции печени и нормализацией общего состояния у 77,8% животных на 5-е сутки после операции. Внутрибрюшинное введение цианокобаламина оказывает

преимущественное влияние на азотистый обмен, повышение экспрессии факторов роста IL-1 β и TGF- β 1, пролиферативную активность гепатоцитов, что приводит к восстановлению 85,26% массы печени на 14-е сутки после резекции. Полученные результаты обусловлены различными механизмами действия данных препаратов. Адеметионин улучшает состояние клеточной стенки гепатоцитов, препятствует цитолизу и перекисному окислению липидов и белков, восстанавливает состояние фосфолипидов и белков-гистонов.

Цианокобаламин, в свою очередь, способствует активации первичных и вторичных митогенов, декомпактизации примембранного хроматина и вступлению гепатоцитов в митоз, тем самым стимулируя пострезекционную регенерацию как за счет пролиферации, так и гипертрофии клеток. Однако, при его внутрибрюшинном введении происходит распространение препарата с кровотоком и снижение его воздействия в результате депонирования в легких.

Во II блоке исследования на 5-е сутки после резекции печени нормализация общего состояния наблюдалась при внутripеченочном введении цианокобаламина (опытная группа) у всех животных, что превышало показатели 1-й контрольной группы (внутripеченочное введение NaCl) на 83,33%, 2-й контрольной (внутripеченочное введение адеметионина) – на 94,44%. Следует отметить, что к 14-м суткам в каждой из контрольных групп нормализации общего состояния у 16,67% животных не отмечали.

При оценке восстановления массы печени к 14-м суткам наилучшие показатели наблюдались в опытной группе – 95,27%, что превышало показатели 1-й контрольной группы на 13,40%, 2-й контрольной – на 25,98%.

Наибольшие показатели цитолиза были зарегистрированы на 5-е сутки эксперимента при внутripеченочном введении адеметионина. Нормализация АСТ, АЛТ, ЩФ, ГГТП и ОХ на 7-е сутки после резекции печени отмечалась

только в опытной группе. При оценке показателей синдрома печеночно-клеточной недостаточности наблюдалось значительное снижение белково-синтетической функции печени и нарушение углеводного и азотистого обменов у всех животных. В опытной группе на 7-е сутки отмечали нормализацию уровней ГЛ, КР и МЧ. Общий белок к 14-м суткам после операции был значительно снижен во всех группах, при этом лучший результат был зарегистрирован в опытной группе – на 8,09% ниже нормы. Наибольшая активность ферментативной системы антиоксидантной защиты отмечалась на 5-е и 7-е сутки после резекции печени в опытной группе, при этом наблюдали значительное снижение продуктов окисления. В большей степени окислительный стресс был выражен при внутripеченочном введении адеметионина.

Динамика показателей экспрессии факторов роста демонстрировала повышение более чем в 2 раза показателей IL-1 β и TGF- β 1 в опытной группе, в сравнении с 1-й контрольной группой. Во 2-й контрольной группе отмечалось снижение концентрации первичных и вторичных митогенов.

При оценке результатов гистологических и иммуногистохимических методов исследования на 14-е сутки после резекции при внутripеченочном введении цианокобаламина было выявлено повышение пролиферативной активности гепатоцитов, индекса пролиферации Ki-67 в 3,84 раза, в сравнении с 1-й контрольной группой, а также отсутствие фиброзных изменений в печени.

Отмечалось негативное влияние внутripеченочного введения адеметионина на печеночную ткань, снижение количества митозов на 48,38%, в сравнении с 1-й контрольной группой, а также развитие фиброзных, цирротических и воспалительных изменений.

При окрашивании по Массону-Голднеру оценивали расположение, размер и количество коллагеновых волокон в строме печени. Изменения структуры печеночной ткани не было выявлено в 1-й контрольной и опытной

группах. При внутripеченочном введении адеметионина (2-я контрольная группа) отмечалось увеличение количества и утолщение коллагеновых волокон, а также формирование периваскулярного фиброза.

Таким образом, исследования, проведенные во II блоке, демонстрируют, что при внутripеченочном введении цианокобаламина наблюдается практически полная нормализация показателей синдромов цитолиза и холестаза, восстановление углеводного и жирового обменов, снижение окислительного стресса, повышение экспрессии факторов роста, пролиферативной активности гепатоцитов в 3,84 раза, что приводит к восстановлению до 95,27% от исходной массы печени к 14-м суткам после резекции. Полученные результаты, вероятнее всего, связаны с направленным транспортом цианокобаламина в печень и возможностью его локального воздействия, это приводит к активации хроматина в ядрах гепатоцитов, повышению синтеза метильных групп и процессов метилирования ДНК, что стимулирует пролиферативную активность гепатоцитов и вступление в митоз даже малоактивных клеток. Наблюдается быстрое восстановление массы печени и, как результат, восстановление ее функциональной активности и защитных свойств. При внутripеченочном введении адеметионина выявлены значительные нарушения функции печени, которые не восстанавливались к 14-м суткам после резекции, снижение защитных антиоксидантных свойств, показателей IL-1 β и TGF- β 1, а также развитие фиброзных, цирротических и воспалительных изменений печени. Полученные данные могут быть связаны с изменением внутренней среды клетки при внутripеченочном введении адеметионина и, как результат, наличием выраженных воспалительных изменений, которые приводят к замещению ткани печени соединительной тканью с развитием фиброзных и цирротических процессов.

В III блоке исследования нормализация общего состояния наблюдалась на 5-е сутки после операции при применении способа внутривенного введения цианокобаламина с внутрибрюшинным введением адemetионина (опытная группа) – у всех животных, что превышало показатели контрольной группы (внутрибрюшинное введение адemetионина и цианокобаламина) на 22,22%. При оценке восстановления массы печени к 14-м суткам максимальные показатели наблюдались также в опытной группе – 95,04% от исходной.

При изучении динамики показателей цитолитического синдрома наибольшие значения были зарегистрированы в контрольной группе на 1-е сутки после резекции печени. Нормализация показателей отмечалась в опытной группе на 7-е сутки, в контрольной – на 14-е сутки. Восстановление параметров холестатического синдрома после резекции печени было зарегистрировано только в опытной группе: ЩФ, ГГТП, ОХ – на 7-е сутки, БЛ – на 14-е сутки. При оценке показателей синдрома печеночно-клеточной недостаточности наблюдалось снижение белково-синтетической функции печени и нарушение углеводного и азотистого обменов у всех животных. В опытной группе на 7-е сутки отмечали нормализацию ГЛ и МЧ, на 14-е сутки – ОБ и КР, в контрольной группе – только МЧ и КР на 14-е сутки после операции. При анализе липидного профиля нормализация более чем 50% показателей наблюдалась только в опытной группе к 7-м суткам после резекции печени.

Наибольшая активность ферментативной и неферментативной систем защиты отмечалась на 5-е сутки после резекции печени в опытной группе, что привело к значительному снижению количества продуктов окисления. На 14-е сутки эксперимента показатели МДА и ДНФГ в опытной группе были ниже на 33,28% и 71,43%, в сравнении с данными контрольной группой.

Оценка динамики показателей экспрессии факторов роста демонстрирует значительное повышение IL-1 β и TGF- β 1 в опытной группе –

на 5-е сутки данные показатели превышали значения контрольной группы на 20,00% и 27,23%, на 7-е сутки – на 108,45% и 31,52%, соответственно.

При оценке результатов морфологических и иммуногистохимических методов исследования было определено влияние внутрипеченочного введения цианокобаламина, дополненного внутрибрюшинным введением адеметионина на повышение пролиферативной активности гепатоцитов.

Следует отметить при этом отсутствие фиброзных и воспалительных изменений в печени при внутрипеченочном введении цианокобаламина, дополненном внутрибрюшинным введением адеметионина, а также повышение индекса пролиферации гепатоцитов на 68,84% в сравнении с контрольной группой.

Исследования, проведенные в III блоке, демонстрируют, что внутрипеченочное введение цианокобаламина, дополненное внутрибрюшинным введением адеметионина, на 7-е сутки после резекции печени способствует нормализации показателей синдромов цитолитиза, холестаза, печеночно-клеточной недостаточности, активации систем антиоксидантной защиты, снижению продуктов окисления, повышению IL-1 β на 108,45% и TGF- β 1 на 31,23%, в сравнении с контрольной группой. Также следует отметить, что при применении разработанного способа наблюдается повышение пролиферативной активности гепатоцитов на 68,84%, что приводит к восстановлению к 14-м суткам после резекции 95,04% от исходной массы печени, при отсутствии фиброзных и воспалительных изменений.

Таким образом, в результате выполнения 3-х блоков исследования было установлено следующее.

При внутрипеченочном введении цианокобаламина наблюдается преимущественное повышение экспрессии факторов роста и пролиферативной активности гепатоцитов; адеметионина – нормализация общего состояния животных и купирование окислительного стресса.

Внутрипеченочное введение цианокобаламина способствует снижению показателей цитолиза и холестаза, восстановлению углеводного и жирового обменов, повышению экспрессии факторов роста, пролиферативной активности гепатоцитов. Однако, внутрипеченочное введение адеметионина сопровождается развитием фиброзных, цирротических и воспалительных изменений.

Разработанный способ внутрипеченочного введения цианокобаламина с внутрибрюшинным применением адеметионина способствует наиболее быстрой нормализации биохимических показателей, купированию окислительного стресса, повышению IL-1 β и TGF- β 1, пролиферативной активности гепатоцитов.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны способ стимуляции пострезекционной регенерации печени, основанный на интраоперационных внутривнутрипеченочном введении цианокобаламина с внутривнутрибрюшинным применением адеметионина и устройство для его осуществления.

2. Внутривнутрибрюшинное введение цианокобаламина обеспечивает повышение экспрессии факторов роста IL-1 β и TGF- β 1 и пролиферативной активности гепатоцитов, что приводит к восстановлению на 14-е сутки после резекции 85,26% от исходной массы печени, в сравнении с группой, в которой стимуляцию репаративной регенерации печени не выполняли ($p < 0,05$), оказывает минимальное влияние на синдромы цитолиза, холестаза, печеночно-клеточной недостаточности, окислительного стресса. Внутривнутрибрюшинное введение адеметионина способствует нормализации общего состояния животных в 77,78% случаев, отдельных биохимических показателей, купированию окислительного стресса, восстановлению к 14-м суткам послеоперационного периода 75,70% от исходной массы печени; не оказывает значимого влияния на динамику факторов роста и морфологические характеристики печеночной ткани.

3. Внутривнутрипеченочное введение цианокобаламина способствует снижению показателей синдромов цитолиза и холестаза, восстановлению углеводного и жирового обменов, повышению экспрессии факторов роста, пролиферативной активности гепатоцитов в 3,84 раза, приводит к восстановлению исходной массы печени после резекции к 14-м суткам на 13,4% больше, в сравнении с внутривнутрипеченочным введением 0,9% раствора NaCl ($p < 0,05$). Внутривнутрипеченочное введение адеметионина приводит к повышению показателей синдромов цитолиза, холестаза и печеночно-клеточной недостаточности, окислительного стресса, снижению скорости репаративной регенерации печеночной ткани, показателей IL-1 β и TGF- β 1 в сравнении с внутривнутрипеченочным введением 0,9% раствора NaCl ($p < 0,05$), а

также к развитию фиброзных, цирротических и воспалительных изменений, отсутствующих в других группах.

4. Разработанный способ внутripеченочного введения цианокобаламина с внутpибрюшинным применением адеметионина, на 7-е сутки после резекции печени способствует нормализации биохимических показателей, купированию окислительного стресса, повышению IL-1 β на 108,45% и TGF- β 1 на 31,23%, пролиферативной активности гепатоцитов на 68,84%, что приводит к восстановлению исходной массы печени после резекции к 14-м суткам на 8,67% больше, в сравнении с внутpибрюшинным введением обоих препаратов ($p < 0,05$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. После резекции ~ 70% массы печени с целью ускорения процессов регенерации целесообразно интраоперационное внутripеченочное введение цианокобаламина с внутripбрюшинным введением адеметионина.

2. С целью стимуляции пролиферативной активности гепатоцитов, повышения репаративного потенциала печени при резекции ~ 70% ее массы рекомендовано интраоперационное внутripеченочное введение цианокобаламина.

3. С целью активации систем антиоксидантной защиты, нормализации биохимических показателей при резекции ~ 70% массы печени рекомендовано интраоперационное внутripбрюшинное введение адеметионина.

4. При применении цианокобаламина и адеметионина для стимуляции пострезекционной регенерации печени противопоказания отличающиеся от указанных производителем не выявлены.

5. В связи с экспериментально доказанными цирротическими, фиброзными и воспалительными изменениями ткани печени внутripеченочное введение адеметионина не рекомендовано.

6. Внутripеченочное и внутripбрюшинное применение адеметионина и цианокобаламина рекомендовано осуществлять с использованием разработанного устройства для введения препаратов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Результаты проведенного исследования являются теоретической основой для изучения клеточных и генных механизмов регуляции репаративной регенерации печени. Исследование создает теоретические предпосылки для изменения концепции интра- и послеоперационного ведения пациентов при обширных операциях на печени, дальнейшего морфологического и иммуногистохимического изучения функционирования гепатоцитов при наличии факторов, влияющих на процессы метилирования ДНК и запускающих митотическое деление клетки.

В рамках договора с Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере №1510ГССС15-L/8798, создано малое промышленное предприятие ООО «Унимед» (директор А.Ю. Лаптиёва), целью работы которого является организация серийного производства разработанного устройства для инъекционного введения лекарственных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акопян, В. М. Эффекты фактора роста гепатоцитов / В. М. Акопян, А. В. Сергиенко, М. Н. Ивашев // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – № 4-2. – С. 376-377.
2. Альперович, Б. И. Роль криохирургических вмешательств при повторных операциях по поводу альвеококкоза / Б. И. Альперович, Н. В. Мерзликин, В. Н. Сало // Креативная хирургия и онкология. – 2012. – № 2. – С. 20-24.
3. Анатомические сегментарные резекции при метастазах колоректального рака в печень / В. А. Вишне夫斯基, М. Г. Ефанов, О. В. Паклина [и др.] // Анналы хирургической гепатологии. – 2010. – Том 15, № 3. – С. 48-57.
4. Асташов, В. Л. Оценка интраоперационной кровопотери и послеоперационной печеночной недостаточности после резекции печени с применением высоких технологий / В. Л. Асташов, Е. Н. Солонцова // Высокотехнологическая медицина. – 2014. – Том 1, № 1. – С. 29-34.
5. Берестяная, А. Н. Метилирование как важнейший механизм эпигенетической регуляции у эукариот / А. Н. Берестяная // Успехи современной биологии. – 2014. – Том 134, № 4. – С. 363-376.
6. Биоимпендансный анализ паренхимы печени при ее обширной резекции в эксперименте / С. Д. Леонов, Д. Н. Панченков, Р. Б. Алиханов [и др.] // Анналы хирургической гепатологии. – 2014. – Том 19, № 1. – С. 55-59.
7. Василенко, С. А. Синусоидальные клетки печени как компоненты регенераторного потенциала печени / С. А. Василенко, Э. Ш. Мустафаева // Синергия Наук. – 2017. – Том 1, № 18. – С. 1118-1125.
8. Веронский, Г. И. О методах резекции печени / Г. И. Веронский // Анналы хирургической гепатологии. – 2006. – Том 11, № 1. – С. 85-88.

9. Влияние бемитила, этомерзола и яктона на процессы регенерации печени после частичной гепатэктомии / В. В. Гайворонская, С. В. Оковитый, И. Ю. Колышев [и др.] // Биомедицина. – 2013. – Том 1, № 1. – С. 16-21.

10. Влияние критической гипотонии на развитие послеоперационной печеночной недостаточности / Н. Г. Корнилов, С. П. Чикотеев, М. В. Прокопьев [и др.] // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2013. – № 1 (89). – С. 29-33.

11. Влияние однократного введения экзогенного фактора роста гепатоцитов на показатель неспецифической резистентности в условиях пострезекционного повреждения печени / С. А. Лепехова, Л. В. Зарицкая, Е. В. Батунова [и др.] // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2016. – № 1 (107). – С. 49-55.

12. Выбор метода локальной деструкции метастазов колоректального рака в печени / А. В. Чжао, В. А. Вишневский, Д. А. Ионкин [и др.] // Анналы хирургической гепатологии. – 2019. – Том 24, № 4. – С. 30-36.

13. Газизов, И. М. Апоптоз в регенерационном гистогенезе печени после частичной гепатэктомии у крыс / И. М. Газизов, А. А. Гумерова, А. П. Киясов // Гены и Клетки. – 2015. – Том 10, № 3. – С. 22-26.

14. Гальперин, Э. И. Дифференцированный подход к применению минимально инвазивных методов лечения опухолевой механической желтухи / Э. И. Гальперин, Г. Г. Ахаладзе, П. С. Ветшев // Анналы хирургической гепатологии. – 2019. – Том 24, № 2. – С. 10-24.

15. Гарбузенко, Д. В. Механизмы компенсации структуры и функции печени при ее повреждении и их практическое значение / Д. В. Гарбузенко // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2008. – Том 18, № 6. – С. 14-21.

16. Гербек, Ю. Э. Метилирование ДНК и поведение / Ю. Э. Гербек, С. Р. Хантемирова // Природа. – 2014. – № 12 (1192). – С. 30-36.
17. Горелова, И. С. Сывороточные показатели семейства трансформирующего фактора роста- β у пациентов с фиброзом печени при hcv-инфекции / И. С. Горелова, Е. В. Маркелова, Л. Ф. Скляр // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 7-4. – С. 671-674.
18. Грин, И. Р. Редактирование эпигенетических модификаций ДНК / И. Р. Грин, Д. В. Петрова, Д. О. Жарков // Гены и Клетки. – 2016. – Том 11, № 2. – С. 53-60.
19. Громова, О. А. Гепатопротекторные свойства витаминов в преконцепции и при беременности / О. А. Громова, И. Ю. Торшин, Е. Ю. Лисицына // Земский врач. – 2011. – № 4. – С. 23-28.
20. Даминова, Н. М. Экономные и атипичные резекции печени при очаговых заболеваниях / Н. М. Даминова, К. М. Курбонов // Известия Академии наук Республики Таджикистан. Отделение биологических и медицинских наук. – 2007. – № 2. – С. 82-86.
21. Дзидзава, И. И. Осложнения после обширных резекций печени / И. И. Дзидзава, А. В. Слободяник, В. И. Ионцев // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2015. – № 3 (51). – С. 261-266.
22. Диагностическая эффективность трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF- β 1) при подборе индивидуальной дозы такролимуса у детей – реципиентов печени / Р. М. Курабекова, О. М. Цирульникова, О. Е. Гичкун [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2018. – Том 20, № 4. – С. 38-43.
23. Динамика весовых показателей регенерирующей печени после обширной резекции на фоне ишемии-реперфузии / А. С. Карасев, А. С. Сорокина, А. Д. Азизова [и др.] // Смоленский медицинский альманах. – 2023. – № 2. – С. 145-147.

24. Динамика ростовых факторов в селезенке и печени у крыс на разных стадиях воссоздания метастатического процесса печени / Е. М. Франциянц, И. В. Каплиева, Л. К. Трепитаки, Ю.А. Погорелова // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2014. – № 10 (110). – С. 38-43.
25. Ельчанинов, А. В. Проплиферация и клеточная гибель гепатоцитов регенерирующей печени плодов крыс / А. В. Ельчанинов, Г. Б. Большакова // Цитология. – 2012. – Том 54, № 4. – С. 313-317.
26. Емельянова, А. Ю. Витамин В12 в лечении заболеваний нервной системы / А. Ю. Емельянова, О. Е. Зиновьева // РМЖ. – 2016. – Том 24, № 7. – С. 429-433.
27. Журавлев, В. А. Показания к радикальным операциям у больных с очаговыми поражениями печени / В. А. Журавлев, В. М. Русинов // Анналы хирургической гепатологии. – 2010. – Том 15, № 4. – С. 82-89.
28. Затолокин, Д. В. Влияние гептрала на состояние ткани печени после ее резекции / В. Д. Затолокин, А. А. Перков, Н. В. Лунева // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2012. – Том 5, № 2 – С. 319-323.
29. Звездчатые клетки печени стимулируют дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга крысы в гепатоциты *in vitro* / А. А. Гумерова, А. К. Шафигуллина, А. А. Трондин [и др.] // Гены и Клетки. – 2011. – Том 6, № 4. – С. 72-81.
30. Иванов, Ю. В. Возможности минимально инвазивных симультанных операций при сочетанном эхинококкозе печени и легких / Ю. В. Иванов, Д. Н. Панченков, Р. В. Лискевич // Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского. – 2019. – Том 7, № 4 (26). – С. 57-62.

31. Изменения микроструктуры печени после частичной гепатэктомии у крыс / И. М. Газизов, М. С. Калигин, Д. И. Андреева [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Том 8, № 3. – С. 101-105.

32. Изучение экспрессии рецепторов фактора некроза опухоли и интерлейкина в ткани печени у животных, длительно получавших нимесулид / Л. В. Лазаренко, П. В. Косарева, Е. И. Самоделкин, В. П. Хоринко // Пермский медицинский журнал. – 2017. – Том 34, № 3. – С. 65-71.

33. Искра, А. И. Перспектива использования биотехнологий для коррекции печеночной недостаточности (обзор литературы) / А. И. Искра, С. А. Лепехова // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2014. – № 1 (95). – С. 112-119.

34. Использование бактериального агониста рецептора фактора роста гепатоцитов для ускорения регенерации печени при остром токсическом гепатозе / Я. М. Чаленко, К. А. Собянин, Е. В. Сысолятины [и др.] // Гены и Клетки. – 2017. – Том 12, № 3. – С. 93.

35. Исследование физико-механических характеристик шовного материала в эксперименте при операциях на печени / В. А. Липатов, Д. А. Северинов, А. А. Денисов [и др.] // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2020. – Том 28, № 2. – С. 193-199.

36. К вопросу о лечении закрытых травм печени / А. Г. Гринцов, С. М. Антонюк, В. Б. Ахрамеев [и др.] // Вестник неотложной и восстановительной хирургии. – 2021. – Том 6, № 1. – С. 61-67.

37. К вопросу о резекции печени / А. Х. Мустафин, А. И. Грицаенко, В. В. Погадаев, Р. Р. Иштуков // Креативная хирургия и онкология. – 2013. – № 1-2. – С. 21-26.

38. Камчатнов, П. Р. Когнитивные нарушения при дефиците витамина В, фолиевой кислоты и гипергомоцистеинемии / П. Р. Камчатнов, И. В. Дамулин // Клиницист. – 2015. – Том 9, № 1. – С. 18-23.

39. Кляшева, Р. И. Модуляция метилирования ДНК и реорганизация структуры хроматина под влиянием витамина В12 и адреналина у эукариот : специальность 03.00.04 «Биохимия» : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук / Кляшева Раиса Ивановна ; Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова. – Рязань, 1996. – 32 с.
40. Козлов, В. А. Метилирование ДНК клетки и патология организма / В. А. Козлов // Медицинская иммунология. – 2018. – Том 10, № 4-5. – С. 307-318.
41. Кокудо, Н. Резекция печени при метастатических опухолях (лекция) / Н. Кокудо, И. Кавагучи // Анналы хирургической гепатологии. – 2012. – Том 17, № 3. – С. 40-44.
42. Колесник, И. М. Оценка влияния фармакологического пре кондиционирования рекомбинантным эритропоэтином на состояние резецированной печени в эксперименте / И. М. Колесник, В. А. Лазаренко, М. В. Покровский // Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье. – 2015. – № 2. – С. 74-78.
43. Коррекция регенерации печени с помощью фотодинамической терапии / Э. Могилевец, П. Гарелик, Н. Прокопчик [и др.] / Наука и инновации. – 2021. – № 9 (223). – С. 79-83.
44. Косых, А. А. Роль клеточных и межклеточных взаимодействий в механизмах регенерации печени / А. А. Косых // Вятский медицинский вестник. – 2006. – № 1. – С. 79-86.
45. Котельникова, Л. П. Резекции печени у больных с очаговыми заболеваниями на фоне диффузных поражений / Л. П. Котельникова, И. Е. Китаева, И. М. Будянская // Медицинский альманах. – 2011. – № 2. – С. 75-78.
46. Кригер, А. Г. Робот-ассистированные операции в абдоминальной хирургии / А. Г. Кригер, С. В. Берелавичус. – Москва : Медпрактика-М, 2017. – 130 с. – ISBN 978-5-98803-375-2.

47. Кротова О. А. Роль МСКТ на этапе планирования трансплантации печени / О. А. Кротова, Е. К. Яковлева // Медицинская визуализация. – 2013. – № 2. – С. 53-57.

48. Кротова, О. А. Синдром «Недостаточного размера печени» после резекции и трансплантации фрагмента печени / О. А. Кротова, Д. А. Гранов, И. О. Руткин // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2012. – Том 171, № 3. – С. 113-116.

49. Курабекова, Р. М. Трансформирующий фактор роста $\beta 1$ при трансплантации печени / Р. М. Курабекова, О. П. Шевченко, О. М. Цирульникова // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2015. – Том 17, № 3. – С. 76-82.

50. Лапароскопически ассистированная резекция печени при выраженном спаечном процессе / Д. Н. Панченков, Р. Б. Алиханов, Ю. В. Иванов [и др.] // Анналы хирургической гепатологии. – 2014. – Том 19, № 3. – С. 17-20.

51. Лебедева, Е. И. Клеточно-молекулярные механизмы фиброгенеза печени / Е. И. Лебедева, О. Д. Мяделец // Гепатология и гастроэнтерология. – 2019. – Том 3, № 2. – С. 119-126.

52. Лепехова, С. А. Роль фактора роста гепатоцитов в регенерации печени / С. А. Лепехова, К. А. Апарцин, А. И. Искра // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 7-1. – С. 187-192.

53. Лепехова, С. А. Современные методы коррекции и профилактики печеночной недостаточности / С. А. Лепехова, П. О. Иноземцев, Л. И. Федорова // Эффективная фармакотерапия. – 2020. – Том 16, № 1. – С. 46-51.

54. Лечебная тактика при закрытых травмах печени / Е. Ю. Евтихова, А. К. Гагуа, Р. М. Евтихов [и др.] // Вестник ивановской медицинской академии. – 2006. – Том 11, № 1-2. – С. 39-41.

55. Лечение токсического гепатита у пациентов, перенесших COVID-19 / И. В. Маев, Р. И. Шабуров, А. И. Павлов [и др.] // Терапевтический архив. – 2022. – Том 94, № 12. – С. 1413-1420.

56. Лызииков, А. Н. Механизмы регенерации печени в норме и при патологии / А. Н. Лызииков, А. Г. Скуратов, Б. Б. Осипов // Проблемы здоровья и экологии. – 2015. – № 1 (43). – С. 4-9.

57. Люндуп, А. В. Стволовые / прогениторные клетки печени и костного мозга как регуляторы восстановительной регенерации поврежденной печени / А. В. Люндуп // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – Том 12, № 2. – С. 100-107.

58. Марахова, А. И. Характеристика витамина В12 и основные продуценты при его получении / А. И. Марахова, Д. К. Смагулова, И. Е. Станишевская // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2015. – № 12. – С. 104-107.

59. Марков, П. В. Отдаленные результаты реконструктивных и восстановительных операций на внепеченочных желчных протоках / П. В. Марков // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3. – С. 160.

60. Махмудова, А. А. В12-дефицитная анемия / А. А. Махмудова // Международный научный вестник. – 2018. – № 4-7. – С. 1041-1044.

61. Медведев, Д. В. Молекулярные механизмы токсического действия гомоцистеина / Д. В. Медведев, В. И. Звягина // Кардиологический вестник. – 2017. – Том 12, № 1. – С. 52-57.

62. Методы оценки функционального статуса печени при планировании анатомических резекций по поводу первичных и метастатических опухолей: современное состояние проблемы, собственный опыт и перспективы / Д. В. Сидоров, Н. А. Рубцова, А. В. Леонтьев [и др.] // Исследования и практика в медицине. – 2015. – Том 2, № 1. – С. 13-20.

63. Могилевец, Э. В. Методы стимуляции регенерации при циррозе печени / Э. В. Могилевец, П. В. Гарелик, Н. И. Батвинков // Новости хирургии. – 2013. – Том 21, № 3. – С. 103-109.

64. Морозова, Т. Е. Витамины группы В в клинической практике / Т. Е. Морозова, О. С. Дурнецова // Медицинский совет. – 2014. – № 18. – С. 72-77.

65. Морфологическая оценка репаративной регенерации экспериментальных кровотокающих ран печени с применением метода хирургического гемостаза / Ю. А. Пархисенко, А. К. Воронцов, Е. Ф. Чередников [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2023. – Том 30, № 3. – С. 64-67.

66. Морфологические изменения печени после ее резекции и введение биоматериала аллоплант / А. Х. Мустафин, А. Х. Мустафин, М. А. Нартайлаков [и др.] // Морфологические ведомости. – 2008. – Том 1, № 3-4. – С. 58-61.

67. Морфология печени при CCl₄-индуцированном циррозе под влиянием фотодинамической терапии / Э. В. Могилевец, П. В. Гарелик, С. М. Зиматкин [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. – 2015. – № 1 (43). – С. 71-75.

68. Натальский, А. А. Проблема печеночной недостаточности в хирургии / А. А. Натальский, С. В. Тарасенко, О. Д. Песков. // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2013. – № 1. – С. 61-73.

69. Неврологические расстройства при дефиците витамина В12 / Ч. С. Павлов, И. В. Дамулин, Ю. О. Шульпекова, Е.А. Андреев // Терапевтический архив. – 2019. – Том 91, № 4. – С. 122-129.

70. Новый фактор роста, стимулирующий регенерацию печени крыс / С. F. Chang, J. Yang, X. F. Li [et al.] // Молекулярная биология. – 2016. – Том 50, № 3. – С. 457-465.

71. О потенциальном противоопухолевом эффекте витамина B12 / О. А. Громова, Л. В. Стаховская, И. Ю. Торшин [и др.] // Российский журнал боли. – 2017. – № 2 (53). – С. 62-73.

72. Обширные резекции печени при осложнениях местнораспространенного рака печени / С. М. Ахмедов, Б. Д. Сафаров, Н. А. Расулов, З. В. Табаров // Анналы хирургической гепатологии. – 2014. – Том 19, № 4. – С. 26-31.

73. Определение активности изоформ пируваткиназы в норме, при токсическом повреждении и в процессе регенерации печени / А. Н. Лызиков, А. С. Шафорост, А. А. Зятыков, Н. М. Голубых // Проблемы здоровья и экологии. – 2021. – Том 18, № 3. – С. 116-123.

74. Основные осложнения обширных резекций печени и пути их предупреждения / В. Д. Фёдоров, В. А. Вишневецкий, Н. А. Назаренко [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2007. – Том 6, № 3. – С. 16-21.

75. Оценка параметров операционного стресса после лапароскопических и открытых резекций печени / Д. Н. Панченков, Г. Б. Алексанян, Н. К. Ахматова [и др.] // Доктор.Ру. – 2017. – № 2 (131). – С. 69-75.

76. Оценка риска развития пострезекционной печеночной недостаточности / Ю. С. Винник, С. С. Дунаевская, А. А. Косик, Р. Ю. Хлобыстин // Дальневосточный медицинский журнал. – 2021. – № 2. – С. 33-36.

77. Патогенетическое и клиническое обоснование комплексной профилактики гипергомоцистеинемии / М. Ю. Андрианова, Е. В. Ройтман, А. М. Исаева [и др.] // Архивъ внутренней медицины. – 2014. – № 4 (18). – С. 32-38.

78. Петросян, Т. Р. Клетки участвующие в регенерации печени: стволовые клетки, овальные клетки, клетки Ито, гибридные гепатоциты.

Стволовые клетки в генезе ГЦК и лечении цирроза // Синергия Наук. – 2017. – Том 1, № 17. – С. 927-933.

79. Плеханов, А. Н. Апоптоз, некроз и регенерация печени / А. Н. Плеханов, А. И. Товаршинов // Вестник Бурятского государственного университета. – 2008. – № 12. – С. 90-94.

80. Пострезекционная печеночная недостаточность: современные проблемы определения, эпидемиологии, патогенеза, факторов риска, профилактики и лечения / В. А. Вишневский, Ю. А. Коваленко, О. И. Андрейцева [и др.] // Украинский журнал хирургии. – 2013. – № 3 (22). – С. 172-182.

81. Предоперационная лучевая навигация в определении хирургической тактики при эхинококкозе печени / А. В. Шабунин, А. А. Карпов, В. В. Бедин [и др.] // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2023. – № 3. – С. 5-13.

82. Принципы диагностики и лечения травм печени / А. С. Ибадильдин, В. И. Кравцов, С. А. Ибадильдина, Т. А. Искакова // Вестник Казахского национального медицинского университета. – 2021. – № 3. – С. 187-190.

83. Прогностические критерии печеночной недостаточности после резекции печени при ее очаговом поражении / М. С. Новрузбеков, Л. В. Донова, Е. Н. Ходарева [и др.] // Анналы хирургической гепатологии. – 2009. – Том 14, № 1. – С. 41-48.

84. Противоопухолевые эффекты сочетанного применения витаминов В1, В6 и В12 / Л. В. Стаховская, О. А. Громова, И. Ю. Торшин, М. В. Филимонова // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2017. – Том 9, № 4. – С. 101-105.

85. Пчелинцева Е. В. Динамика маркеров повреждения печени в крови после криорезекции по поводу очаговых поражений органа // APRIORI. Серия: Естественные и технические науки. – 2015. – № 3. – С. – 25.

86. Рандомизированное контролируемое клинико-экономическое исследование применения Прогепара у пациентов с хроническим алкогольным гепатитом / Н. В. Юдина, Е. Ю. Егорова, М. С. Философова [и др.] // Качественная Клиническая Практика. – 2011. – № 1. – С. 72-84.

87. Регенерация печени млекопитающих / А. В. Ельчанинов, Т. Х. Фатхудинов, А. В. Макаров [и др.] // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2012. – № 4. – С. 57-61.

88. Резекция VII-VIII сегментов печени: есть ли целесообразность реконструкции правой печеночной вены? / Ю. И. Патютко, Д. В. Подлужный, А. Н. Поляков [и др.] // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2021. – № 4. – С. 29-33.

89. Результаты резекционных вмешательств на печени на фоне хронической диффузной гепатологии / Ф. Г. Назыров, М. М. Акбаров, А. В. Девятков [и др.] // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2015. – Том 8, № 2 (27). – С. 142-150.

90. Роль витаминов в профилактике рака и их влияние на эффективность противоопухолевой терапии: систематический анализ доказательных исследований / О. А. Громова, И. Ю. Торшин, М. В. Филимонова, М. А. Сорокина // Терапия. – 2018. – № 4. – С. 108-120.

91. Роль гепатобилиосцинтиграфии в оценке риска пострезекционной печеночной недостаточности / П. П. Ким, Р. Б. Алиханов, В. В. Цвиркун [и др.] // Анналы хирургической гепатологии. – 2017. – Том 22, № 1. – С. 14-18.

92. Роль макрофагов в регенерации печени после субтотальной резекции у крыс / А. В. Ельчанинов, Т. Х. Фатхудинов, И. В. Арутюнян [и др.] // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2017. – Том 20, № 4. – С. 176-181.

93. Руткин, И. О. Возможности использования icg-nir-хромоскопии при выполнении эндовидеохирургической резекции печени / И. О. Руткин,

М. А. Бикетов, И. В. Тимергалин // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2018. – Том 177, № 5. – С. 80-82.

94. Рыкало, Н. А. Влияние инсулиноподобного фактора-1 на репаративную регенерацию печени при хроническом медикаментозном гепатите у неполовозрелых крыс / Н. А. Рыкало, О. В. Андрощук // Современная медицина: актуальные вопросы. – 2013. – № 26. – С. 150-160.

95. Современные представления о печеночной недостаточности в хирургии / А. А. Натальский, С. В. Тарасенко, О. В. Зайцев, О. Д. Песков // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2014. – Том 22, № 4. – С. 138-147.

96. Современные представления об этиопатогенезе печеночной недостаточности в хирургии / С. В. Тарасенко, А. А. Натальский, О. Д. Песков, О. В. Зайцев // Хирург. – 2014. – № 8. – С. 4-11.

97. Сравнительный анализ периоперационных результатов лапароскопических и открытых резекций печени при гепатоцеллюлярном раке / Р. Б. Алиханов, М. Г. Ефанов, В. В. Цвиркун [и др.] // Анналы хирургической гепатологии. – 2020. – Том 25, № 2. – С. 49-54.

98. Степанова, Ю. А. Ультразвуковая диагностика на этапах лечения эхинококкоза печени / Ю. А. Степанова, А. Б. Гончаров, А. В. Чжао // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2022. – Том 15, № 3 (56). – С. 244-253.

99. Трансплантация печени при метастазах нейроэндокринных опухолей. Обзор литературы и клиническое наблюдение / С. Э. Восканян, А. И. Артемьев, Е. В. Найденов [и др.] // Анналы хирургической гепатологии. – 2022. – Том 27, № 3. – С. 33-45.

100. Трансформирующий фактор роста p1 при трансплантации печени детям раннего возраста / Р. М. Курабекова, О. П. Шевченко, О. М. Цирульникова [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Том 16, № 4. – С. 27-32.

101. Тупикин, К. А. Новые возможности прогнозирования пострезекционной печеночной недостаточности / К. А. Тупикин, Ю. А. Коваленко, В. А. Вишневский // *Анналы хирургической гепатологии*. – 2016. – Том 21, № 3. – С. 70-74.

102. Тупикин, К. А. Пострезекционная печеночная недостаточность (факторы риска, профилактика, прогноз) : специальность 14.01.17. «Хирургия» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Тупикин Кирилл Алексеевич ; ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова. – Москва, 2017. – 24 с.

103. Уровень трансформирующего фактора роста бета-1 связан с тяжестью врожденных заболеваний печени у детей раннего возраста / Р. М. Курабекова, О. П. Шевченко, О. М. Цирульникова [и др.] // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2016. – Том 18, № 3. – С. 16-21.

104. Участие клеток итo в гистогенезе и регенерации печени / А. А. Гумерова, А. П. Киясов, М. С. Калигин [и др.] // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. – 2007. – Том 2, № 4. – С. 39-46.

105. Фактор роста гепатоцитов – маркер регенеративной способности печени / М. Ф. Денисова, Н. Н. Музыка, Н. В. Чернега, М. Б. Дыба // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. – 2014. – № 5 (105). – С. 51-52.

106. Факторы риска развития дефицита витамина В12 и его последствия / В. П. Вдовиченко, Г. М. Бронская, О. А. Борисенко, Т. А. Коршак // *Медицинские новости*. – 2019. – № 8. – С. 13-18.

107. Факторы, определяющие уровень гомоцистеина, в когорте российских пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца / О. О. Шахматова, А. Л. Комаров, Д. В. Ребриков // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. – 2010. – Том 9, № 4. – С. 49-58.

108. Характеристика витамина В12 и основные продуценты при его получении / Л. Ф. Сахибгараева, А. И. Марахова, Д. К. Смагулова, И. Е. Станишевская // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2015. – № 3 (12). – С. 104-107.

109. Хирургия печени: от истоков развития до современных возможностей / С. В. Перескоков, А. В. Дмитриев, В. С. Грошилин [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 5. – С. 170.

110. Цирроз печени / О. М. Михеева, Е. Д. Ли, Г. Б. Селеванова [и др.] // Клиническая геронтология. – 2010. – Том 16, № 1-2. – С. 39-47.

111. Экспрессия генов цитокинов и факторов роста в печени после субтотальной резекции у крыс / А. В. Ельчанинов, Т. Х. Фатхудинов, Н. Ю. Усман [и др.] // Гены и Клетки. – 2016. – Том 11, № 1. – С. 61-67.

112. Экспрессия экзогенных ДНК-метилтрансфераз: использование в молекулярной и клеточной биологии. Обзор / О. В. Дьяченко, С. В. Тарлачков, Д. В. Маринич [и др.] // Биохимия. – 2014. – Том 79, № 2. – С. 115-127.

113. Almasio, P. Ademetionina: stato dell'arte e prospettive future [Ademetionine: the state of the art and future prospects] / P. Almasio, L. Pagliaro // Annali italiani di medicina interna. – 1993. – 8 Suppl. – P. 52S-55S.

114. Aspects of transition cow metabolomics-Part I: Effects of a metaphylactic butaphosphan and cyanocobalamin treatment on the metabolome in liver, blood, and urine in cows with different liver metabotypes / M. Schären, T. Snedec, B. Riefke [et al.]. – DOI 10.3168/jds.2020-19055 // Journal of Dairy Science. – 2021. – Volume 104, Issue 8. – P. 9205-9226.

115. Aspects of transition cow metabolomics-Part II: Histomorphologic changes in the liver parenchyma throughout the transition period, in cows with different liver metabotypes and effects of a metaphylactic butaphosphan and cyanocobalamin treatment / F. Pietsch, M. Schären, T. Snedec [et al.]. – DOI

10.3168/jds.2020-19057 // Journal of Dairy Science. – 2021. – Volume 104, № 8. – P. 9227-9244.

116. Current progress in hepatic tissue regeneration by tissue engineering / V. Hosseini, N. F. Maroufi, S. Saghati [et al.]. – DOI 10.1186/s12967-019-02137-6 // Journal of Translational Medicine. – 2019. – Volume 17, № 1. – P. 383-407.

117. Daoust, R. The numerical proportions of cell types in rat liver during carcinogenesis by 4-dimethylaminoazobenzene (DAB) / R. Daoust, A. Cantero // Cancer Research. – 1959. – Volume 19. – P. 757-762.

118. Early derangement of INR predicts liver failure after liver resection for hepatocellular carcinoma / A. B. S. Silva, M. Greensmith, P. K. Praseedom [et al.]. – DOI 10.1016/j.surge.2022.01.002 // Surgeon. – 2022. – Volume 20, № 5. – P. e288-e295.

119. Fedosov, S. N. Low methylcobalamin in liver tissues is an artifact as shown by a revised extraction procedure / S. N. Fedosov, E. Nexø, C. W. Heegaard. – DOI 10.1016/j.bbagen.2023.130315 // Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects. – 2023. – Volume 1867, № 4. – 130315.

120. First report about the mode of action of combined butafosfan and cyanocobalamin on hepatic metabolism in nonketotic early lactating cows / L. Kreipe, A. Deniz, R. M. Bruckmaier, H. A. van Dorland. – DOI 10.3168/jds.2010-4080 // Journal of Dairy Science. – 2011. – Volume 94, № 10. – P. 4904-4914.

121. Functional and cellular evaluation of the liver after low-power laser stimulation during surgery / Y. P. A. Godoy, S. Gerson, M. S. Pinto [et al.]. – DOI 10.1590/0102-6720201700020010 // Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva. – 2017. – Volume 30, № 2. – P. 122-126.

122. Ghanim, A. M. H. Vanillin augments liver regeneration effectively in Thioacetamide induced liver fibrosis rat model / A. M. H. Ghanim, N. S. Younis, H. A. Metwaly. – DOI 10.1016/j.lfs.2021.120036 // Life Sciences. – 2021. – Volume 286. – 120036.

123. Goodman, Z. D. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases / Z. D. Goodman. – DOI 10.1016/j.jhep.2007.07.006 // Journal of Hepatology. – 2007. – Volume 47, № 4. – P. 598-607.

124. Halsted, C. H. Vitamin-dependent methionine metabolism and alcoholic liver disease / C. H. Halsted, V. Medici. – DOI 10.3945/an.111.000661 // Advances in Nutrition. – 2011. – Volume 2, № 5. P. 421-427.

125. Higgins, G. M. Experimental pathology of the liver / G. M. Higgins, R. Anderson // Archives of Pathology & Laboratory Medicine. – 1931. – Volume 12. – P. 186-202.

126. Homocysteine, Liver Function Derangement and Brain Atrophy in Alcoholics / C. Fernández-Rodríguez, E. González-Reimers, G. Quintero-Platt [et al.]. – DOI 10.1093/alcalc/agw031 // Alcohol & Alcoholism. – 2016. – Volume 51, № 6. – P. 691-697.

127. Hu, C. Mesenchymal stromal cells promote liver regeneration through regulation of immune cells / C. Hu, Z. Wu, L. Li. – DOI 10.7150/ijbs.39725 // International Journal of Biological Sciences. – 2020. – Volume 16, № 5. – P. 893-903.

128. Hu, C. Pre-treatments enhance the therapeutic effects of mesenchymal stem cells in liver diseases / C. Hu, Z. Wu, L. Li. – DOI 10.1111/jcmm.14788 // Journal of Cellular and Molecular Medicine. – 2020. – Volume 24, № 1. – P. 40-49.

129. Huang, J. Elucidating the metabolic regulation of liver regeneration / J. Huang, D. A. Rudnick. – DOI 10.1016/j.ajpath.2013.04.034 // The American Journal of Pathology. – 2014. – Volume 184, № 2. – P. 309-321.

130. Interleukin-26 promotes the proliferation and activation of hepatic stellate cells to exacerbate liver fibrosis by the $\text{tgf-}\beta\text{1}/\text{smad2}$ signaling pathway / X. Zhang, X. Xie, Y. Wang [et al.] // International Journal of Clinical and Experimental Pathology. – 2019. – Volume 12, № 12. – P. 4271-4279.

131. Kirillova, I. Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor kappaB activation / I. Kirillova, M. Chaisson, N. Fausto // *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research.* – 1999. – Volume 10, № 12. – P. 819-828.
132. Liver and vitamin B12 parameters in patients with anorexia nervosa before and after short-term weight restoration / F. I. Tam, I. Chocholi, I. Hellerhoff [et al.]. – DOI 10.1016/j.psychres.2022.114673 // *Psychiatry Research.* – 2022. – Volume 314. – 114673.
133. Liver resection in Cirrhotic liver: Are there any limits? / A. Chan, A. Kow, T. Hibi [et al.]. – DOI 10.1016/j.ijssu.2020.06.050 // *International Journal of Surgery.* – 2020. – Volume 82S. – 109-114.
134. Management of post-hepatectomy complications / S. Jin, Q. Fu, G. Wuyun, T. Wuyun. – DOI 10.3748/wjg.v19.i44.7983 // *World Journal of Gastroenterology.* – 2013. – Volume 19, № 44. – P. 7983-7991.
135. Mechanisms underlying cell therapy in liver fibrosis: an overview / D. Pinheiro, I. Dias, K. Ribeiro Silva [et al.]. – DOI 10.3390/cells8111339 // *Cells.* – 2019. – Volume 8, № 11. – P. 1339-1369.
136. Metformin increases liver accumulation of vitamin B12 – an experimental study in rats / E. Greibe, J. W. Miller, S. H. Foutouhi [et al.]. – DOI 10.1016/j.biochi.2013.02.002 // *Biochimie.* – 2013. – Volume 95, № 5. – P. 1062-1065.
137. Michalopoulos, G. K. Principles of liver regeneration and growth homeostasis / G. K. Michalopoulos. – DOI 10.1002/cphy.c120014 // *Comprehensive Physiology.* – 2013. – Volume 3, № 1. – C. 485-513.
138. Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase / J. L. Guéant, M. Caillerez-Fofou, S. Battaglia-Hsu [et al.]. – DOI 10.1016/j.biochi.2013.01.020 // *Biochimie.* – 2013. – Volume 95, № 5. – P. 1033-1040.

139. Noninvasive imaging of hepatic dysfunction: A state-of-the-art review / T. Duan, H. Y. Jiang, W. W. Ling, B. Song. – DOI 10.3748/wjg.v28.i16.1625 // World Journal of Gastroenterology. – 2022. – Volume 28, № 16. – P. 1625-1640.
140. Parenchyma-Sparing Liver Resection or Regenerative Liver Surgery: Which Way to Go? / F. Botea, A. Bârcu, A. Kraft [et al.]. – DOI 10.3390/medicina58101422 // Medicina (Kaunas). – 2022. – Volume 58, № 10. – P. 1422-1438.
141. Plasmatic higher levels of homocysteine in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) / S. C. De Carvalho, M. T. Muniz, M. D. Siqueira [et al.] // Journal of Nutrition. – 2013. – Volume 12. – P. 37-42.
142. Preziosi, M. E. Update on the Mechanisms of Liver / M. E. Preziosi, S. P. Monga. – DOI 10.1055/s-0037-1601351 // Seminars in Liver Disease. – 2017. – Volume 37, № 2. – P. 141-151.
143. Regeneration of cirrhotic liver in rabbits after intrahepatic injection of cryoprecipitate / A. F. Chernousov, T. V. Khorobrykh, R. V. Karpova, T. P. Nekrasova. – DOI 10.1007/s10517-013-1959-x // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2013. – Volume 154, № 3. – P. 396-398.
144. Spence, J. D. B vitamins for NASH: Use methylcobalamin, not cyanocobalamin / J. D. Spence. – DOI 10.1016/j.jhep.2022.08.019 // Journal of Hepatology. – 2023. – Volume 78, 1. – e34-e35.
145. Starlinger, P. Hemostasis and Liver Regeneration / P. Starlinger, J. P. Luyendyk, D. J. Groeneveld. – DOI 10.1055/s-0040-1715450 // Seminars in Thrombosis and Hemostasis. – 2020. – Volume 46, № 6. – P. 735-742.
146. Stem cell therapy in liver regeneration: Focus on mesenchymal stem cells and induced pluripotent stem cells / L. Zhang, X. J. Ma, Y. Y. Fei [et al.]. – DOI 10.1016/j.pharmthera.2021.108004 // Pharmacology and Therapeutics. – 2022. – Volume 232. – 108004.
147. Study on the association between TGF- β 1 and liver fibrosis in patients with hepatic cystic echinococcosis / F. Tian, Y. Liu, J. Gao [et al.]. – DOI

10.3892/etm.2019.8355 // Experimental and Therapeutic Medicine. – 2019. – Volume 19, № 2. – P. 1275-1280.

148. The concentration of tumor necrosis factor- α determines its protective or damaging effect on liver injury by regulating Yap activity / S. Zhao, J. Jiang, Y. Jing [et al.]. – DOI 10.1038/s41419-020-2264-z // Cell Death and Disease. – 2020. – Volume 11, № 1. – P. 70-83.

149. The region-specific cellular and molecular basis of liver regeneration after acute pericentral injury / S. Wang, X. Wang, Y. Shan [et al.]. – DOI 10.1016/j.stem.2024.01.013 // Cell Stem Cell. – 2024. – Volume 31, № 3. – P. 341-358.

150. The effects of vitamin B12 supplementation on metabolic profile of patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial / H. R. Talari, M. R. Molaqanbari, M. Mokfi [et al.]. – DOI 10.1038/s41598-022-18195-8 // Scientific Reports. – 2022. – Volume 12, № 1. – P. 14047.

151. The use of light-emitting diodes to stimulate mitochondrial function and liver regeneration of partially hepatectomized rats / T. Castro-e-Silva, O. Castro-e-Silva, C. Kurachi [et al.]. – DOI 10.1590/s0100-879x2007000800006 // Brazilian Journal of Medical and Biological Research. – 2007. – Volume 40, № 8. – P. 1065-1069.

152. Tian, Y. Surgical treatment of acute calculous cholecystitis complicated with hepatic dysfunction / Y. Tian, X. Suo. – DOI 10.1097/MD.00000000000020239 // Medicine (Baltimore). – 2020. – Volume 99, № 24. – e20239.

153. Tripathi, M. B vitamins for NASH: Use methylcobalamin, not cyanocobalamin / M. Tripathi, B. Kumar Singh, P. M. Yen. – DOI 10.1016/j.jhep.2022.10.004 // Journal of Hepatology. – 2022. – Volume 78, Issue(1). – e35-e36.

154. Tsai, J. M. Partial lobular hepatectomy: a surgical model for morphologic liver regeneration / J. M. Tsai, I. L. Weissman, Y. Rinkevich. – DOI

10.3791/57302 // Journal of Visualized Experiments. – 2018. – Volume 135. – P. 57302.

155. Upregulation of PDGF Mediates Robust Liver Regeneration after Nanosecond Pulsed Electric Field Ablation by Promoting the HGF/c-Met Pathway / J. Qian, J. Liu, L. Hong [et al.]. – DOI 10.1155/2020/3635787 // BioMed Research International. – 2020. – Article ID 3635787.

156. Vitamin B12 and folate decrease inflammation and fibrosis in NASH by preventing syntaxin 17 homocysteinylation / M. Tripathi, B. K. Singh, J. Zhou [et al.]. – DOI 10.1016/j.jhep.2022.06.033 // Journal of Hepatology. – 2022. – Volume 77, № 5. – P. 1246-1255.

157. Wang, B. Phospholipid Remodeling in Physiology and Disease / B. Wang, P. Tontonoz. – DOI 10.1146/annurev-physiol-020518-114444 // Annual Review of Physiology. – 2019. – Volume 81. – P. 165-188.

158. Wang, R. Effects of dietary supplementation of different levels of vitamin B12 on the liver metabolism of laying hens / R. Wang, Y. Bai, Y. Yang. – DOI 10.1002/jsfa.11928 // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2022. – Volume 102, № 13. – P. 5787-5794.