

УДК 616.36–003.93–089.87:575.191

## УСИЛЕНИЕ ПОСТРЕЗЕКЦИОННОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ ПУТЕМ ПОТЕНЦИРОВАНИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК

Лаптиёва А.Ю., Андреев А.А.

*Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко, Воронеж,  
e-mail: laptievaa@mail.ru*

В мире рак печени является пятой локализацией по числу ежегодно регистрируемых новых случаев и четвертой по количеству смертей. Метастатическое поражение печени выявляется у 20–70% онкологических больных. Резекция печени в большинстве случаев остается основным методом лечения, однако, частота развития пострезекционной печеночной недостаточности варьирует в пределах от 0,7 до 9,1%. Целью исследования является улучшение эффективности профилактики пострезекционной печеночной недостаточности, путем потенцирования метилирования ДНК гепатоцитов. Эксперименты выполнены на 54 половозрелых самцах крыс линии Wistar, которым выполняли типичную резекцию около 70% объема печени. В 1 группе лечение не проводилось, во 2 группе интраоперационно, внутripеченочно вводили раствор хлорида натрия, в 3 группе – раствор цианокобаламина. При потенцировании метилирования ДНК цианокобаламином к 14 суткам исследования наблюдается восстановление 94,26%±2,96% от исходной массы печени, нормализация уровня биохимических показателей крови, повышение выработки фактора роста TGF-β1, усиление активности цитокинов, снижение окислительного стресса. Таким образом, предложенный метод улучшения эффективности профилактики пострезекционной печеночной недостаточности способствует повышению пролиферативной активности гепатоцитов, обеспечивает наиболее быстрое восстановление анатомической и функциональной целостности печени.

**Ключевые слова:** пролиферация, метилирование ДНК, резекция, регенерация

## STRENGTHENING POST-RESECTION LIVER REGENERATION BY POTENTIATION OF DNA METHYLATION

Laptiyova A.Yu., Andreev A.A.

*N.N. Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, e-mail: laptievaa@mail.ru*

In the world, liver cancer ranks fourth in the number of deaths, and the localization of the tumor in the liver is the fifth most common. Metastatic liver disease is detected in 20–70% of cancer patients. Liver resection remains the main method of treatment in most cases, however, the incidence of post-resection hepatic insufficiency varies from 0.7 to 9.1%. The aim of the study is to improve the effectiveness of prevention of post-resection hepatic insufficiency by potentiating DNA methylation of hepatocytes. The experiments were performed on 54 eugamic male Wistar rats, which underwent typical resection of about 70% of the liver volume. The treatment was not carried out in group 1, solution of sodium chloride was administered intraoperatively внутripеченочно in group 2, in group 3 – solution of cyanocobalamin. When potentiating DNA methylation with cyanocobalamin by 14 days of the study, there is a recovery of 94.26%±2.96% of the initial mass of the liver, normalization of the level of biochemical blood parameters, increased production of growth factor TGF-β1, increased activity of cytokines, reduction of oxidative stress. Thus, the proposed method of improving the effectiveness of prevention of post-resection hepatic insufficiency improves the proliferative activity of hepatocytes, provides the fastest recovery of anatomical and functional integrity of the liver.

**Keywords:** proliferation, DNA methylation, resection, regeneration

В мире рак печени является пятой локализацией по числу ежегодно регистрируемых новых случаев (437 тыс. или 5,4% от всех злокачественных заболеваний) и четвертой по количеству смертей (427 тыс. или 8,2%) [1–3]. Ежегодно в мире выявляют около 800 тыс. больных. В России гепатоцеллюлярный рак составляет 1,7–2,5% всех злокачественных новообразований [1, 4]. Метастатическое поражение печени выявляется у 20–70% онкологических больных [1]. Резекция печени в большинстве случаев остается основным методом лечения, но радикальную операцию удается выполнить только у 60–70% [2, 4]. Опуская крайние варианты, частота развития пострезекционной печеночной недостаточности варьирует

в пределах от 0,7 до 9,1% [3,5,6]. Пятилетняя выживаемость больных с данным осложнением в лучших клиниках мира не превышает 38–50% [3, 4, 6].

Таким образом, на современном этапе развития медицины, поиск новых методов стимуляции репаративной регенерации печени остается актуальной задачей, решение которой приведет к уменьшению сроков восстановления печеночной ткани, снижению риска развития печеночной недостаточности.

Цель исследования. Повышение эффективности профилактики пострезекционной печеночной недостаточности, путем потенцирования метилирования ДНК гепатоцитов цианокобаламином.

### Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили на 54 лабораторных животных – половозрелых самцах крыс линии Wistar, которых разделили на 3 группы по 18 в каждой. Всем животным осуществляли типичную резекцию в объёме 70% от исходной массы печени. В 1-й группе лечение не проводилось и она рассматривалась как контрольная. Во 2-й группе непосредственно после резекции в сохраненные доли печени вводили 0,9% раствор хлорида натрия. В 3-й группе животных интраоперационно в паренхиму сохранённых долей печени вводили витамин В<sub>12</sub> в концентрации 200 мкг/мл. Животных выводили из эксперимента на 1-е, 7-е и 14-е сутки после операции, взвешивали массу регенерировавшей печени, производили забор крови для оценки биохимических показателей (билирубин, щелочная фосфатаза, аминотрансферазы, гамма-глутамил-транспептидаза, холестерин, белки, глюкоза, мочевины, креатинин), и факторов роста (IL-β и TGF-β1). Осуществляли оценку показателей окислительного стресса (МДА, SH-группы, СОД, ДНФГ). Также производили взятие гистологического материала (паренхимы печени). Изучали морфологические особенности резецированной печени, проводили оценку пролиферативной активности гепатоцитов – иммуногистохимическое исследование (окрашивание Ki-67). Статистическая обработка выполнялась с помощью пакета «Описательная статистика» программы Excel, для оценки достоверно-

сти различий рассчитывали критерий сравнения Стьюдента. Достоверными считались различия при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

При оценке регенерировавшей массы печени на момент выведения животных из эксперимента в контрольной группе животных на 1 сутки отмечается восстановление  $36,38\% \pm 3,06\%$  от исходной массы печени, во 2-й группе –  $41,91\% \pm 5,02\%$ , в 3-й группе –  $46,33\% \pm 2,35\%$ ; к 14 суткам в 3-й группе животных наблюдается практически полное восстановление массы печени –  $94,26\% \pm 2,96\%$ , в сравнении с контрольной группой ( $80,98\% \pm 4,63\%$ ) (рис. 1).

При проведении биохимического анализа крови к 14 суткам исследования отмечается нормализация уровней следующих показателей: билирубин, АСАТ, АЛАТ, креатинин, мочевины, холестерин в 3-й группе животных, в сравнении с контрольной группой, в которой нормализации показателей не наблюдается. При оценке уровня в крови животных цитокина IL-β в 3 группе животных отмечается нарастание содержания с 1 по 14 сутки ( $26,44 \pm 2,6$  пг/мл – 1-е сутки,  $89,33 \pm 9,78$  пг/мл – 14-е сутки), в 1-й и 2-й группах животных наибольший показатель наблюдается на 7 сутки  $35,24 \pm 7,39$  пг/мл и  $62,22 \pm 8,12$  пг/мл соответственно (рис. 2,3). При внутривенном введении цианокобаламина на 1-е сутки исследования экспрессия TGF-β1 повышается в 2 раза в сравнении с контрольной группой.

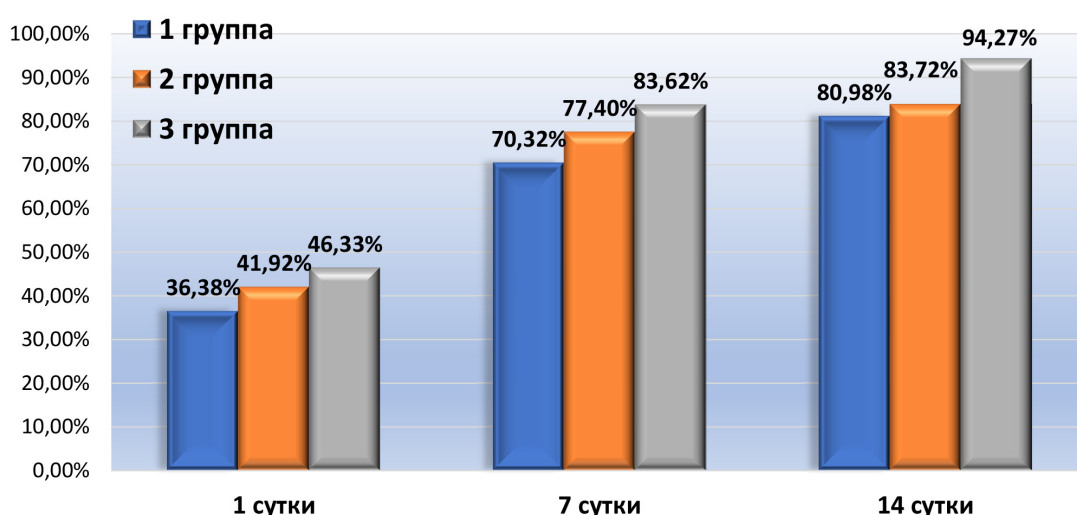


Рис. 1. Динамика восстановления массы печени после типичной резекции

При оценке показателей окислительного стресса в 3 группе животных в сравнении с контрольной группой к 14 суткам исследования отмечается снижение уровней МДА на  $17,12\% \pm 3,5\%$  и ДНФГ на  $12,33\% \pm 4,08\%$ , повышение уровней СОД и SH-групп на  $30,17\% \pm 4,03\%$  и  $21,56\% \pm 3,75\%$  соответственно. Полученные результаты биохимического исследования крови свидетельствуют о восстановлении обменных процессов в печени к 14 суткам исследования. Усиление экспрессии TGF- $\beta$ 1 и IL- $\beta$  при введении цианокобаламина способствует ускорению процессов репаративной регенерации, т.к. данные факторы являются первичными митогенами, активирующими митотическое деление. Снижение уровней МДА и ДНФГ, повышение уровней СОД и SH-групп свидетельствует о снижении окислительного стресса.

При световой микроскопии биоптатов печени окрашенных гематоксилином-эозином на 1 сутки исследования, выявлено наличие одноядерных и двоядерных гепатоцитов в соотношении 9:1. Значительное увеличение количества двоядерных гепатоцитов к 14 суткам отмечается в 3-й группе животных ( $21,3\% \pm 3,68\%$ ), в сравнении с контрольной группой ( $12,71\% \pm 5,51\%$ ). Это связано с тем, что при внутривенном введении витамина B<sub>12</sub> в митотический цикл вступают не только способные к активному делению гепатоциты, но и стареющие, что приводит к незавершенному митозу и образованию двоядерных клеток. Так как общим принципом репаративной регенерации является прежде всего восстановление суммарного тканевого генома, полиплоидизацию, получаемую в данном случае, можно назвать эквивалентом клеточного размножения.

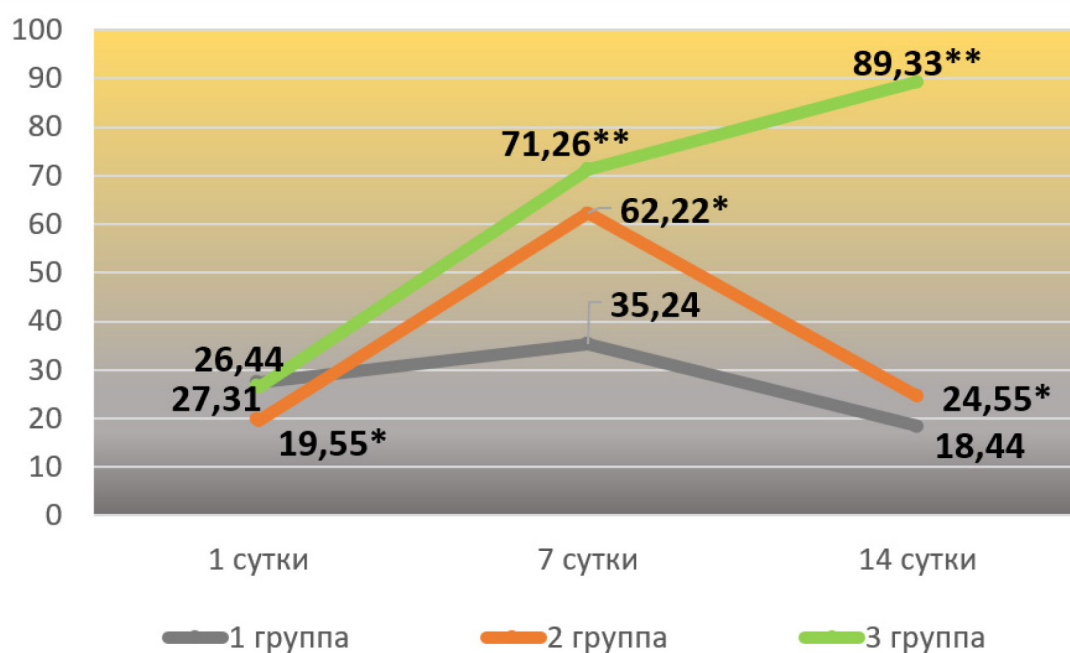


Рис. 2. Оценка уровня в крови животных цитокина IL- $\beta$   
(\* –  $p < 0,05$  при сравнении 2-й контрольной группы с 1-й контрольной группой;  
\*\* –  $p < 0,05$  при сравнении 1-й опытной группы с 1-й контрольной группой)

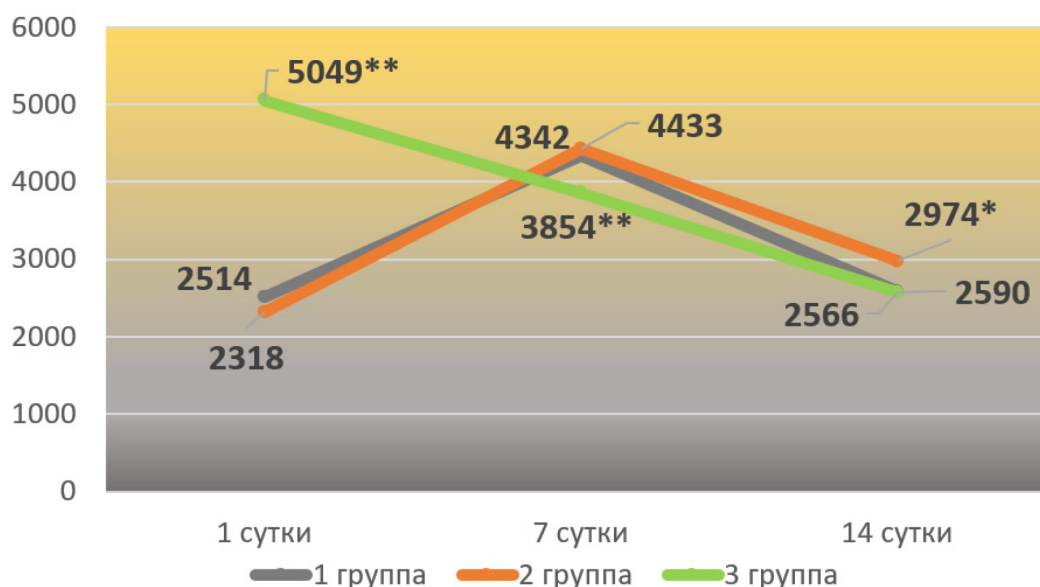


Рис. 3. Оценка уровня в крови животных экспрессии TGF-β1  
 (\* –  $p < 0,05$  при сравнении 2-й контрольной группы с 1-й контрольной группой;  
 \*\* –  $p < 0,05$  при сравнении 1-й опытной группы с 1-й контрольной группой)

При иммуногистохимическом исследовании ткани регенерировавшей печени отмечается повышение пролиферативной активности одноядерных и двоядерных гепатоцитов после типичной резекции во всех экспериментальных группах. На 14 сутки исследования наибольшая пролиферативная активность наблюдается при введении цианокобаламина (индекс пролиферации одноядерных гепатоцитов –  $6,22\% \pm 0,54\%$ , двоядерных гепатоцитов –  $0,059\% \pm 0,034\%$ ) в сравнении с контрольной группой (индекс пролиферации одноядерных гепатоцитов –  $2,54 \pm 0,29\%$ , двоядерных гепатоцитов –  $0,039 \pm 0,027\%$ ). Полученный результат подтверждает повышение пролиферативной активности гепатоцитов при внутривенном введении цианокобаламина.

### Заключение

Предложенный метод улучшения эффективности профилактики пострезекционной печеночной недостаточности обеспечивает наиболее быстрое восстановление анатомической и функциональной целостности печени. Потенцирование метилирования ДНК к 14 суткам исследования приводит к восстановлению  $94,26\% \pm 2,96\%$  от исходной массы печени, нормализации уровня биохимических показателей крови, повышению

выработки фактора роста TGF-beta1, усилению активности цитокинов, снижению окислительного стресса, повышению пролиферативной активности гепатоцитов.

### Список литературы

1. Суконко О.Г., Моисеев П.И., Мигаль Т.Ф., Якимович Г.В., Кирпиченко Т.Н. Рак в Европе: взгляд на проблему, сравнительный анализ некоторых показателей // Поволжский онкологический вестник. – 2012. – №3. [Электронный ресурс]. – URL: <http://oncovestnik.ru/index.php/arkhiv/item/314-rak-v-evrope-vzglyad-na-problemu-sravnitelnyj-analiz-nekotorykh-pokazatelej> (дата обращения: 12.02.2019).
2. Андреев А.А., Лаптиёва А.Ю., Остроушко А.П. Репаративная регенерация печени после оперативного лечения первичных опухолей и метастатическом поражении печени // Многопрофильный стационар. – 2018. – Т. 5; № 2. – С. 100–104.
3. Вишневский В.А. Анатомические сегментарные резекции при метастазах колоректального рака в печень // Анналы хирургической гепатологии. – 2010. – Т. 15; № 3. – С. 48–57.
4. Michalopoulos G.K. Principles of liver regeneration and growth homeostasis // Comprehensive Physiology. – 2013. – №3. – С. 485–513.
5. Taub R. Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration // The FASEB Journal. – 1996. – Т. 10, № 4. – С. 413–427.
6. Fausto N., Laird A.D., Webber E.M. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration // The FASEB Journal. – 1995. – Т. 9, № 15. – С. 1527–1536.