

Влияние локального криоповреждения печени на основные биохимические гепатозависимые показатели сыворотки крови у кроликов

И. В. СЛЕТА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Liver Local Cryodamage on Main Biochemical Hepato-Dependent Blood Plasma Indices in Rabbits

SLETA I.V.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

В сыворотке крови кроликов с нормальной печенью и с экспериментальным циррозом печени изучали динамику содержания общего белка, глюкозы, активности щелочной фосфатазы (ЩФ), аланин- и аспаратаминотрансфераз (АлТ и АсТ), уровня малонового диальдегида (МДА) после локальной криодеструкции печени. Анализ динамики указанных показателей позволил сделать заключение, что локальная криодеструкция нормальной печени вызывает кратковременные и умеренные нарушения ее функциональной активности, а локальное криовоздействие на цирротически измененную печень существенно не усугубляет характерные для этого заболевания метаболические сдвиги.

У сироватці крові кроликів з нормальною печінкою і з експериментальним циррозом печінки вивчали динаміку вмісту загального білка, глюкози, активності лужної фосфатази, аланін- і аспаратамінотрансфераз, рівню малонового діальдегіду після локальної криодеструкції печінки. Аналіз динаміки зазначених показників дозволив зробити висновок, що локальна криодеструкція нормальної печінки викликає короточасні і помірні порушення її функціональної активності, а локальний криовплив на циротично змінену печінку істотно не збільшує характерні для цього захворювання метаболічні зрушення.

In blood serum of rabbits with normal liver and experimental liver cirrhosis we investigated the dynamics of the content of total protein, glucose, activity of alkaline phosphatase (Aph), alanine- and aspartate aminotransferases (ALT and AsT), level of malone dialdehyde (MDA) after a local liver cryodestruction. Analysis of the dynamics of the mentioned indices allowed to conclude that local cryodestruction of normal liver has caused short-term and moderate impairments of its functional activity, and local cryoeffect on cirrhosis-changed liver significantly did not aggravate metabolic changes, characteristic for this disease.

Любое повреждение печеночной паренхимы сопровождается нарушением различных метаболических функций печени, что отражается на содержании соответствующих метаболитов в сыворотке крови. Чаще всего выраженность метаболических нарушений в сыворотке коррелирует с тяжестью повреждения органа. При очаговых (опухоль, кисты, альвеококкоз) и диффузных (хронический гепатит, цирроз печени) поражениях печени применяется локальная криодеструкция. Локальное криоповреждение, образуя в печени ограниченную зону некроза и окружающий его воспалительный барьер, должно вызывать и определенные метаболические реакции. При этом, очевидно, эти реакции на криовоздействие нормальной и патологически измененной печени могут существенно отличаться, прежде всего по интенсивности.

При изучении метаболических эффектов криоповреждения печени в сыворотке крови здоровых кроликов и с экспериментальным циррозом определяли ряд биохимических показателей, характеризующих функциональное состояние печени и степень ее повреждения. Данные сведения могут помочь в диагностике возможных побочных реакций на криоповреждения, прогнозировании результатов криохирургии и контроле эффективности восстановительных процессов.

Эксперименты проведены на 19 кроликах породы Шиншилла обоего пола весом 3,0-3,5 кг. Эффекты криовоздействия изучали на здоровых животных

Any damage of liver parenchyma is accompanied with the impairment of various metabolic hepatic functions, that affects the content of corresponding metabolites in blood serum. Manifestation of metabolic injuries in a serum often correlates with the severity of an organ damage. Local cryodestruction is used when treating focal liver damages (tumors, cysts, alveococcosis) and diffuse ones (chronic hepatitis, liver cirrhosis). Local cryodestruction, when forming in liver a limited necrosis zone and inflammatory barrier, surrounding necrosis also should cause certain metabolic reactions. Obviously, in the given case these responses of normal and pathologically changed liver to cryoeffect may significantly differ, first of all, by the intensity.

When studying metabolic effects of liver cryodamage in blood serum of healthy rabbits and animals with experimental cirrhosis we determined the series of biochemical indices, characterizing a functional liver state and its damage degree. The data may be helpful in the diagnostics of side reactions to cryodamage, forecasting the results of cryosurgery and in controlling the efficiency of recovering processes.

The experiments were performed in 3.0-3.5 kg' Chinchilla rabbits (19 animals) of both sexes. Cryoeffect was studied in healthy animals (7 rabbits) and ones with experimental cirrhosis (12 rabbits), which was induced by subcutaneous injection of 40%

(7 кроликов) и животных с экспериментальным циррозом (12 кроликов), который вызывали подкожным введением 40%-го масляного раствора CCl_4 2 раза в неделю на протяжении 3-х месяцев из расчета 0,2 мл раствора на 1 кг массы согласно методике [3].

Криовоздействие на печень осуществляли при лапароскопической операции под гексеналовым наркозом с помощью азотного криозонда с диаметром аппликатора 11 мм в 2-х точках, экспозиция 2 мин в каждой, что приводило к промораживанию печени на всю глубину на участке, составляющем около 10% ее массы.

Кровь для биохимических исследований брали из краевой вены уха до утреннего кормления животных до криовоздействия (исходные показатели) и в динамике на протяжении 2-х месяцев. Показатели определяли на 1-е, 3-и, 7-е, 14-е и 60-е сутки после операции.

В сыворотке крови экспериментальных животных изучали динамику содержания общего белка [2], концентрации глюкозы, активности ЩФ, АлТ и АсТ, а также уровень МДА. Достоверность результатов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Как известно, печень является ключевым органом основных аспектов метаболизма, в том числе углеводного, белкового и жирового обмена.

Анализ динамики глюкозы в крови обследованных животных (табл. 1) свидетельствовал, что криовоздействие не вызывало выраженных функциональных нарушений в печени, затрагивающих углеводный обмен, а также не отягощало его нарушения, связанные с развитием экспериментального цирроза. Интегральным показателем состояния белкового обмена является содержание общего белка в сыворотке крови. Известно, что наиболее частым следствием заболеваний печени является гипопроteinемия, так как именно в печени синтезируется 90% белков сыворотки, в том числе весь альбумин, большинство глобулинов, многие белки системы свертывания крови, фибринолиза и другие белки [2].

В наших экспериментах криовоздействие на нормальную печень вызывало умеренную гипопроteinемию уже на 1-е сутки наблюдений (табл. 1). Наиболее низкий уровень общего белка (на 40% ниже нормы, $p < 0,01$) отмечался на 3-и сутки после криовоздействия. К концу 2-го месяца показатель полностью нормализовался.

Развитие экспериментального цирроза печени кроликов вызывало выраженную гипопроteinемию – содержание общего белка в сыворотке снижалось на 16% ($p < 0,05$). Локальная криодеструкция цирротически измененной печени с уже угнетенной белоксинтетической функцией приводила к дополнительному углублению гипопроteinемии: содержание общего белка в сыворотке было снижено в течение 2-х недель исследования по сравнению с исходными показателями в данной группе на 10-20%, ($p < 0,05$). Кроме того, в первые 2 недели после

oil solution of CCl_4 twice a week during 3 months in respect of 0.2 ml solution per 1 kg of the mass according to the method [3].

Cryoeffect on liver was performed during laparoscopic operation under hexenal anesthesia by means of nitrogen cryoprobe with 11mm diameter of an applicator in two points, 2 min exposure in each of them, that resulted in a liver freezing in all its depth in the site, making about 10% of its mass.

The blood for biochemical tests was taken out of marginal ear vein before animals' feeding in the morning before the cryoeffect (initial indices) and in the dynamics within two months. The indices were determined to the 1st, 3rd, 7th, 14th and 60th days after the operation.

In blood serum of experimental animals we studied the dynamics of total protein content [2], glucose concentration, alkaline phosphatase activity. Statistical evaluation of the results was estimated by means of Student's t-criterion.

Таблица 1. Влияние локального криоповреждения печени на содержание гепатозависимых метаболитов в сыворотке крови кроликов с нормальной N (n=7) и цирротически измененной C (n = 12) печенью

Table 1. Effect of liver local cryodamage on the content of hepato-dependent metabolites in blood serum of rabbits with normal (n=7) and cirrhosis-changed (n=12) liver

Сроки исследования, сут Terms of investigation, days		Глюкоза, ммоль/л Glucose, mM/l	Общий белок, г/л Total protein, g/l	МДА, мкмоль/мл MDA, mM/ml
Исходные показатели Initial indices	N	3,8±0,46	77,9±2,6	35,1±1,2
	C	6,1±0,75 ²	65,3±1,8 ²	106,3±5,6 ²
1	N	4,1±0,4	70,3±0,2 ¹	25,3±2,9 ¹
	C	6,8±0,57 ²	58,4±2,1 ^{1,2}	188,0±7,7 ^{1,2}
3	N	4,5±0,7	54,0±5,3 ¹	28,8±1,08 ¹
	C	7,1±0,49 ²	52,8±3,3 ¹	95,5±13,7 ²
7	N	5,3±0,35 ¹	69,0±3,0 ¹	17,5±3,6 ¹
	C	7,4±0,65 ²	50,6±4,5 ^{1,2}	122,1±9,6 ²
14	N	4,6±0,5	71,0±1,7 ¹	15,4±3,2 ¹
	C	7,6±0,57 ²	55,4±3,8 ^{1,2}	165,1±6,2 ^{1,2}
60	N	4,15±0,61	74,7±2,1	31,7±2,7
	C	5,8±0,46 ²	62,4±1,7 ²	131,6±4,8 ²

Примечания: ¹ – $p < 0,05$ по отношению к исходным показателям в группе;
² – $p < 0,05$ между показателями животных с нормальной и цирротически измененной печенью

Notes: ¹ – $p < 0,05$ in respect of initial indices in the group;
² – $p < 0,05$ between the indices of animals with normal and cirrhosis-changed liver.

криовоздействия у кроликов с экспериментальным циррозом содержание общего белка в сыворотке было на 15-17% ниже аналогичных показателей у здоровых животных ($p < 0,05$). К концу наблюдений (60-е сутки после криовоздействия) содержание общего сывороточного белка у кроликов с циррозом возвращалось к исходному уровню. В целом можно отметить, что криовоздействие на цирротически измененную печень временно усиливало недостаточность белоксинтетической функции печени.

Известно, что важным звеном в патогенезе многих заболеваний является оксидативный стресс вследствие активации процессов свободнорадикального окисления [1]. Повышение уровня МДА как одного из конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в крови является неспецифическим показателем тяжести патологического процесса [1].

Локальная криодеструкция нормальной печени кроликов воздействовала на концентрацию МДА в сыворотке крови (табл. 1). Значения показателя снижались относительно исходных в 1-е сутки после криовоздействия (на 18%, $p < 0,05$) и продолжали снижаться первые 2 недели наблюдений - на 14-е сутки уровень сывороточного МДА был в 2 раза ниже исходного ($p < 0,001$). К концу исследования уровень МДА в этой группе нормализовывался.

Затравка экспериментальных животных CCl_4 и развитие цирроза печени вызывали резкий подъем уровня МДА в сыворотке (в 3 раза выше нормы, $p < 0,001$). Криовоздействие на цирротически измененную печень в 1-е сутки еще более повышало уровень МДА (на 80% относительно исходного уровня у затравленных животных). Однако на 3-и сутки наблюдений уровень показателя возвращался к исходным значениям и весь остальной период наблюдений за исключением 14-х суток существенно не изменялся. Следует отметить, что весь период исследования уровень МДА у животных с циррозом был в 3-10 раз выше, чем у кроликов с нормальной печенью. Криовоздействие усиливало активность ПОЛ только в отдельные периоды развития патологического процесса (1- и 14-е сутки), а в остальное время существенно не влияло на активизацию процессов ПОЛ в поврежденной печени.

Известно, что основным источником продуктов ПОЛ, в том числе МДА, являются фосфолипиды клеточных мембран [1], поэтому уровень МДА в крови отражает степень деструкции мембранных структур любых клеток организма. В данном случае проведенные морфологические исследования нормальной печени демонстрируют возникновение зоны некроза в результате криовоздействия, что предполагает разрушение определенного количества гепатоцитов и других клеток, однако это не только не сопровождалось выбросом МДА в сыворотку крови, но даже способствовало снижению его уровня в отдельные периоды наблюдений (7-14 сут после криовоздействия). Можно предположить два наиболее вероятных механизма, объясняющих этот

As it is known, liver is a key organ for major aspects of metabolism, hydrogen, protein and lipid exchange as well.

Analysis of glucose dynamics in the blood of examined animals (Table 10) testified to the fact that cryoeffect did not cause manifested functional failures in liver, affecting hydrogen metabolism, as well as did not make aggravate its impairments related to the development of experimental cirrhosis.

The content of total protein in blood serum is an integral index of the state of protein metabolism. It is known that hypoproteinemia is the most spread cause of liver diseases, because 90% of serum proteins are synthesized directly in liver, as well as total albumin, the majority of globulins, many of the proteins of the system of blood coagulation, fibrinolysis etc [2].

In our experiments the cryoeffect on normal liver caused a moderate hypoproteinemia even to the 1st day of observation (Table 1). The lowest level of total protein (by 40% lower comparing to the norm, $P < 0.01$) was noted to the 3rd day after the cryoeffect. To the 2nd month the index has completely normalised.

The development of experimental liver cirrhosis in rabbits caused a manifested hypoproteinemia: total protein content in serum decreased by 16% ($P < 0.05$). Local cryodestruction of cirrhosis-changed liver with already suppressed protein synthesizing function resulted in an additional potentiation of hypoproteinemia: the total protein content in serum was decreased by 10-20% within two weeks of investigation comparing to initial indices in the group. In addition, in first two weeks following cryopreservation the total protein content in serum of rats with experimental cirrhosis was by 15-17% lower than the same indices in healthy animals ($P < 0.05$). To the end of observation (the 60th day following cryoeffect) the content of total serum albumin in rats with cirrhosis returned to the initial level. In general, we can note that cryoeffect on cirrhosis-changed liver temporarily increased an insufficiency of liver protein-synthesizing function.

It is known that oxidative stress resulted from the activation of free-radical oxidation processes is an important link in the pathogenesis of various diseases [1]. An increase of MDA level as one of final products of lipid peroxidation LPO in blood is non-specific index of the pathological process severity [1].

Local cryodestruction of normal liver in rabbits affected the MDA concentration in blood serum (Table 1). The index values decreased in respect of initial data to the 1st day after cryoeffect (by 18%, $P < 0,05$) and continued the reducing during first 2 weeks of observation: to the 14th day the level of serum MDA was twice lower than an initial one ($P < 0.001$). To the end of investigation the MDA level in this group has normalized.

Poisoning of experimental animals with CCl_4 and development of liver cirrhosis caused a sharp increase of MDA level in serum (thrice higher than in the norm, $P < 0.001$). Cryoeffect on cirrhosis-changed liver to the

феномен: задержка продуктов ПОЛ в печени в силу изменения капиллярной проницаемости тканей, подвергшихся криовоздействию, и развитие системной реакции организма на местное криоповреждение печени – компенсаторную гиперактивацию антиоксидантных систем. Очевидно, оба механизма могут действовать только у здоровых животных. При циррозе печени, как известно, отмечается снижение антиоксидантного потенциала [1]. Поэтому у животных с цирротически измененной печенью криовоздействие не вызывало снижения продуктов ПОЛ в крови, однако препятствовало выбросу МДА практически весь период наблюдений. Можно предположить, что криовоздействие при циррозе печени снижает выраженность общего синдрома перекисидации в организме.

Наиболее чувствительным показателем состояния печеночной паренхимы является активность ряда ферментов печени в сыворотке крови, в том числе аминотрансфераз, ЩФ, альдолазы и других [2].

Анализ динамики гепатозависимых ферментов крови (табл. 2) показывает, что локальная криодеструкция печени в основном тормозит их выброс в общее циркуляторное русло. У животных с нормальной печенью повышение активности АсТ в сыворотке отмечалось только в ранний период после криовоздействия (1-3 сут.) на фоне отсутствия повышения активности ЩФ весь период наблюдений. У животных с цирротически измененной печенью наблюдали фазные изменения активности АлТ относительно исходных величин, когда периоды ее снижения (1-, 7-е сутки) чередовались с периодами повышения (3-и, 14-е сутки). Активность АсТ после кратковременного повышения (1-е сутки) снижалась или соответствовала исходным показателям, примерно так же изменялась активность ЩФ.

Обычно явления гипоферментемии при заболеваниях печени подтверждают тяжелую печеночно-клеточную недостаточность [2]. Однако эффекты криовоздействия на нормальную печень в нашем исследовании могут свидетельствовать и о других механизмах данного явления: торможении цитолиза в печеночной паренхиме, задержке метаболитов в печени вследствие нарушения капиллярной проницаемости, а также снижении белоксинтетической активности гепатоцитов. Очевидно, возможно параллельное развитие этих процессов. О нарушении сосудистой проницаемости свидетельствует динамика МДА в сыворотке крови, о подавлении белоксинтетической активности печени – явления умеренной гипопроteinемии при криовоздействии на нормальную печень и транзиторное усугубление гипопроteinемии при криовоздействии на цирротически измененный орган.

Таким образом, по динамике гепатозависимых метаболитов в сыворотке крови можно сделать заключение, что локальная криодеструкция нормальной печени вызывает кратковременные и умеренные нарушения ее функциональной активности, а

1st day increased the MDA level (by 80% in respect of the initial level in poisoned animals). However to the 3rd day of observation the index level returned to initial values and the rest period of observation did not change significantly, except the 14th day. It should be noted that during the whole investigation period the MDA level was by 3-10 times higher in animals with cirrhosis, comparing to the rabbits with normal liver. Cryoeffect increased the LPO activity only during certain periods of the pathological process development (the 1st and 14th days), during the rest of the time it did not affect significantly the activation of LPO processes in a damaged liver.

It is known that phospholipids of cell membranes [1] are the main source for LPO products, and MDA as well, therefore MDA level in blood reflects the destruction extent in membrane structures of any organism cell. In the given case morphological investigations performed for normal liver have demonstrated the appearance of necrosis zone as a result of cryoeffect, supposing the damage of certain number of hepatocytes and other cells, however this process was not only accompanied with MDA release into blood serum, but even promoted to its level reduction during certain periods of observation (the 7-14 days after cryopreservation). Two of the most probable mechanisms can be supposed, explaining this phenomenon: delay of LPO products in liver caused by the change of capillary permeability in the tissues, subjected to cryoeffect, and development of an organism's systemic response to a local liver cryodamage, compensatory hyperactivation of antioxidative system. Obviously, both mechanisms may function only in healthy animals. It is a well-known fact that the reduction of antioxidative potential is noted during liver cirrhosis [1]. Therefore in animals with cirrhosis-changed liver the cryoeffect did not cause the reduction of LPO products in blood, however this fact prevented the MDA release during practically the whole observation period. It can be supposed, that the cryoeffect during liver cirrhosis reduces the manifestation of the total peroxidation syndrome in an organism.

The most susceptible index for the state of liver parenchyma is the activity of the series of liver enzymes in blood serum, as well as aminotransferases, alkaline phosphatase, aldolase etc [2].

Analysis of the dynamics of hepato-dependent blood enzymes (Table 2) has demonstrated that local liver cryodestruction inhibits, mainly, their release into the whole circulatory flow. In animals with normal liver an increase of AsT activity in serum was noted only in early period after the cryoeffect (1-3 day) at the background of the absence of alkaline phosphatase increase during all the observation period. In animals with cirrhosis-changed liver we have noted the phase changes of ALT activity in respect of initial values, when the periods of its reduction (1-7 days) alternated with the periods of increase (the 3rd, the 14th days). AsT

Таблица 2. Влияние локального криповреждения печени на активность гепатозависимых ферментов в сыворотке крови кроликов с нормальной N (n = 7) и цирротически измененной C (n = 12) печенью

Table 2. Effect of local liver cryodamage on the activity of hepato-dependent enzymes in blood serum of rabbits with normal (n=7) and cirrhosis-changed (c=12) liver

Сроки исследования, сут Terms of investigation, days		АЛТ, мкмоль/ч·мл ALT mM/hr ml	АсТ, мкмоль/ч·мл AsT mM/hr ml	ЩФ, ед./л APh units/l
Исходные показатели Initial indices	N	0,52±0,05	0,20±0,03	105,3±16,0
	C	1,3±0,08	0,26±0,07	42,0±7,9
1	N	0,94±0,12	0,58±0,1	126,9±9,0
	C	0,66±0,13	0,42±0,09	70,0±5,1
3	N	0,86±0,1	0,65±0,14	91,3±11,0
	C	3,4±0,78	0,26±0,01	72,0±10,7
7	N	0,65±0,09	0,49±0,07	57,8±9,0
	C	0,36±0,17	0,07±0,009	40,0±6,6
14	N	0,58±0,12	0,35±0,10	60,0±6,5
	C	0,87±0,14	0,32±0,05	31,0±4,0
60	N	0,55±0,2	0,28±0,05	92,3±8,9
	C	0,94±0,15	0,28±0,08	38,5±2,3

Примечания: ¹ – p<0,05 по отношению к исходным показателям в группе;
² – p<0,05 между показателями животных с нормальной и цирротически измененной печенью

Notes: ¹ – p<0,05 in respect of initial indices in the group;
² – p<0,05 between the indices of animals with normal and cirrhosis-changed liver.

локальное криовоздействие на цирротически измененную печень существенно не усугубляет характерные для этого заболевания метаболические сдвиги.

Литература

1. Барабой В.А., Сутковой Д.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии. – Киев:Чернобыльинформ, 1997. 4.1. – С.40-45.
2. Медицинские лабораторные технологии: Справочник / Под ред. А.И.Карпищенко. – СПб.:Интермедика, 1999. – Т.2. – С. 58-59, 100-101.
3. Рубецкой Л.С., Короткина Р.Н. Методика создания экспериментального цирроза печени у кроликов // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1960. – № 7. – С.122-124.

Поступила 2.07.2002

activity after a short-time increase (the 1st day) decreased or corresponded to initial indices, nearly the same change was noted for the alkaline phosphatase activity.

Usually the phenomena for hypoenzymia during liver diseases confirm a severe stage of liver-cellular insufficiency [2]. However the cryoeffect on normal liver in our investigation may also testify to other mechanisms of this phenomena: cytolysis' inhibition in liver parenchyma, metabolites' delay in liver due to the impairment of capillary permeability, as well as the reduction of protein-synthesizing hepatocytes' activity. Obviously, a simultaneous development of these processes is possible. MDA dynamics in blood serum testifies to the impairment of vascular permeability; phenomena of moderate hypoproteinemia during the cryoeffect on normal liver and transitory aggravation of hypoproteinemia at cryoeffect on cirrhosis-changed organ testify to the inhibition of protein-synthesizing liver activity.

Thus, according to the dynamics of hepato-dependent metabolites in blood serum we can conclude, that local cryodestruction of normal liver causes short-term and moderate impairments of its functional activity, and local cryoeffect on a cirrhosis-changed liver does not aggravate the characteristic for this disease metabolic changes.

References

1. Baraboj V.A., Sutkovoy D.A. Oxidative-recovering hemostasis in norm and pathology. – Kiev, 1997. 4.1. – P. 40-45.
2. Medical Laboratory Technologies: Reference book / Ed. By Karpischenko A.I.- St. Petersburg: Intermedika, 1999. – V.2. – P.58-59, 100-101.
3. Rubetskoj L.S., Korotkina R.N. Method for the induction of liver experimental cirrhosis in rabbits // Byull. Experm. Biol. i Med. – 1960. – N7. – P. 122-124.

Accepted in 2.07.2002