

## Влияние криоконсервированных клеток эмбриональной печени на восстановительные процессы при экспериментальном циррозе печени

О.В. ОЧЕНАШКО, Н.А. ВОЛКОВА, А.Ю. ПЕТРЕНКО

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Effect of Cryopreserved Embryonic Liver Cells on Recovering Processes at Experimental Liver Cirrhosis

OCHENASHKO O.V., VOLKOVA N.A., PETRENKO A.YU.

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

В последнее время среди патологий печени человека лидируют диффузные хронические поражения этого органа, причиной возникновения которых являются токсические вещества или вирусные инфекции [2], причем современная терапия таких заболеваний нуждается в совершенствовании. Один из нестандартных подходов в лечении хронических диффузных заболеваний печени – регенерационная терапия, в основе которой лежит стимуляция восстановительной способности печени [1]. В этом отношении представилось перспективным использование суспензии эмбриональной печени, содержащей, кроме клеточных элементов, эмбриоспецифические белки, ростовые факторы и цитокины [6, 10], способные усиливать регенерацию гомологичного органа, вовлеченного в патологический процесс.

Моделирование патологии, по многим показателям сходной с клиническими формами хронических гепатитов и циррозов печени у людей, возможно путем длительного введения малых доз четыреххлористого углерода [8]. Цель работы – изучить влияние криоконсервированных клеток эмбриональной печени (ККЭП) на восстановительные процессы у крыс с экспериментальным циррозом печени.

Работа выполнена на 56 белых крысах-самцах массой 180-200 г, у которых формировали цирроз печени введением  $CCl_4$  [5]. Суспензию ККЭП человека [4] перед началом эксперимента отогревали при  $37^\circ C$  на водяной бане и вводили в пулпу селезенки животных ( $10^7$  клеток/0,3 мл) через 10 сут после завершения курса инъекций  $CCl_4$ . Крысам контрольной группы в пулпу селезенки вводили равный объем среды криоконсервирования.

Об активности восстановительных процессов судили по структурному состоянию печени и биохимическим показателям крови через 14 сут после введения ККЭП. Гистологическое исследование ткани печени проводили на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. В сыворотке крови уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию ТБК-активных продуктов [4], функции печени – по содержанию билирубина и альбумина, используя стандартные наборы “Вектор-бест” и “Sigma” соответственно.

Морфологическую оценку сформированной экспериментальной модели патологически измененной печени проводили через 10 сут после окончания введения  $CCl_4$ , так как на этом сроке созревает соединительная ткань и стихают острые воспалительные процессы в пораженном органе [7]. На гистологических срезах фиксирован-

Recently among human liver pathologies the most widespread ones are diffuse chronic damages of this organ, caused by toxic substances and viral infections [2], and current therapy for such diseases needs an improvement. One of non-traditional approaches when treating chronic diffuse liver diseases is regeneration therapy, based on the stimulation of recovering liver capability [1]. In this respect it seemed to be perspective to use the embryonic liver suspension, containing besides cellular elements embryo-specific proteins, growth factors and cytokines [6, 10], capable of intensifying the regeneration of homologous organ, involved into a pathological process.

Modeling the pathology, which is generally similar to clinical forms of chronic hepatitis and liver cirrhosis in human-beings, is possible by means of usage of long-term injection of low  $CCl_4$  doses. [8]. The aim of this work was studying the effect of cryopreserved embryonic liver cells (CELCs) on recovering processes in rats with experimental liver cirrhosis.

The work was accomplished in 56 white rat males of 180-200g, in those by injecting  $CCl_4$  an induced liver cirrhosis was formed [5]. Suspension of human CELC [4] was thawed under the temperature of  $37^\circ C$  in water bath before starting the experiment and injected into a spleen pulp of animals ( $10^7$  cells/0.3ml) in 10 days after finishing the course of  $CCl_4$  injections. The rats of control group into a spleen pulp were injected with an equal volume of cryopreservation medium.

The activity of recovering processes was estimated on a structural liver state and biochemical blood indices in 14 days after the CELCs injection. Histological investigations of liver tissue were accomplished in paraffin sections, stained by hematoxylin and eosin. In blood serum the level of lipid peroxidation (LPO) was estimated on the content of TBC-active products [4], liver functions – on bilirubin and albumin content, using standard “Vector-best” and “Sigma” sets, correspondingly.

Morphological estimation of formed experimental model for pathologically changed liver was performed in 10 days after  $CCl_4$  injection, because at this term connective tissue was getting mature and acute inflammatory processes diminished in a damaged organ [7]. In histological sections of the fixed liver there were observed manifested changes of organ architecture, manifested in a failure of the trabecular structure of liver lobuli, fibrosis and a nodular parenchyma rearrangement. Hepatocytes, forming the lobuli, demonstrated manifested destructive-dystrophic

ной печени наблюдались выраженные изменения архитектуры органа, проявившиеся в виде нарушения трабекулярного строения печеночных долек, фиброза и узловой перестройки паренхимы. Гепатоциты, формирующие дольки, демонстрировали выраженные деструктивно-дистрофические изменения. Таким образом, морфологическая картина изменений, развившихся в результате длительного введения  $CCl_4$ , позволила охарактеризовать полученную модель патологически измененной печени как экспериментальный цирроз.

Исследование гистологических срезов печени животных, которым вводили среду криоконсервирования, не обнаружило выраженных изменений в картине имевшегося  $CCl_4$ -индуцированного цирроза.

Анализ состояния печени крыс, которым вводили ККЭП, показал, что наряду с сохраняющимися деструктивно-дистрофическими изменениями, характеризующими цирротически измененную печень, обнаруживались морфологические проявления, указывающие на активацию репаративного процесса в органе: количество двуядерных клеток было увеличено по сравнению с контролем, встречались участки паренхимы, сформированные из молодых гепатоцитов со светлой цитоплазмой и увеличенными ядрами, содержащими хроматин и ядрышки.

Известно, что деструктивно-дистрофические изменения в печени, вызываемые длительным введением  $CCl_4$ , сопровождаются значительным изменением биохимических показателей крови [9]. Как видно из таблицы, в плазме крови контрольной группы животных было отмечено: увеличение содержания ТБК-активных продуктов ПОЛ на - 50% , билирубина на - 62%, а содержание альбумина было снижено на 40% ( $p < 0.05$ ). Приведенные данные свидетельствуют о значительном нарушении гомеостаза животных контрольной группы. Введение ККЭП способствовало нормализации уровня ПОЛ и билирубина в плазме крови, однако достоверного восстановления уровня альбумина до нормальных значений не происходило, что, вероятно, связано с малым сроком наблюдения. Можно полагать, что нормализация отдельных биохимических показателей крови взаимосвязана с активацией регенераторно-гиперпластических процессов в патологически измененной печени.

Таким образом, введение ККЭП животным с экспериментальным циррозом вызывает активацию репаративного процесса в патологически измененном органе и способствует нормализации биохимических параметров крови. Обнаруженное положительное действие суспензии ККЭП на организм животных с циррозом печени, вероятно, обусловлено привнесением извне комплекса цитокинов, ростовых факторов и стадийспецифических белков, способных активировать восстановительные процессы.

Биохимические показатели плазмы крови крыс с экспериментальным циррозом печени после введения ККЭП (M=m, n=5-8)  
Biochemical indices of blood plasm in rats with experimental liver cirrhosis after CELC introduction (M=m, n=5-8)

Показатель Index	Норма Norm	Цирроз печени Liver cirrhosis	
		Контроль Control	+ ККЭП + CELC
Билирубин, мкмоль/л Bilirubin, $\mu\text{M}/\text{l}$	7.9 $\pm$ 0.3	12.83 $\pm$ 0.7 <sup>1</sup>	9.5 $\pm$ 0.7 <sup>2</sup>
Альбумин, г/л Albumin, g/l	39.0 $\pm$ 2.1	23.8 $\pm$ 2.9 <sup>1</sup>	27.0 $\pm$ 2.7 <sup>1</sup>
ТБК-активные продукты, нмоль/мл TBA-active products, $\mu\text{M}/\text{l}$	4.5 $\pm$ 0.4	6.7 $\pm$ 0.2 <sup>1</sup>	5.1 $\pm$ 0.3 <sup>2</sup>

**Примечания:**

- <sup>1</sup> - по сравнению с показателем нормы ( $p < 0.05$ );
- <sup>2</sup> - по сравнению с показателем контроля ( $p < 0.05$ ).

**Notes:**

- <sup>1</sup> - comparing to norm index ( $p < 0.05$ );
- <sup>2</sup> - comparing to the control index ( $p < 0.05$ ).

changes. Thus, morphological changes, developed as a result of long-term  $CCl_4$  injection, allowed to characterise the obtained model of pathologically changed liver as experimental cirrhosis.

Studying of histological sections of animals' liver, which were injected with the cryopreservation medium, revealed no manifested changes in the course of  $CCl_4$  induced cirrhosis.

Analysis of rat liver state, being injected with CELC, has demonstrated that together with remaining destructive dystrophic changes, characterising cirrhotically changed liver, there were found morphological manifestations, testifying to the reparative process' activation in an organ: the amount of binuclear cells was increased comparing to the control, there were observed parenchyma sites, being formed of young hepatocytes with a light cytoplasm and increased nuclei, containing chromatin and nucleoli.

It is known that destructive dystrophic changes in a liver, caused by long-term  $CCl_4$  injection, are accompanied with a significant change in the biochemical blood indices [9]. As the table shows, in blood plasm of the control animals' group there was noted the 50% augmentation of the content of TBC-active LPO products, bilirubin increased by 62%, and the albumin amount was reduced by 40%.

These data testify to a considerable impairment in the animals' homeostasis of the control group. CELC injection promoted to the normalisation of the level of LPO and bilirubin in blood plasm, however no statistically significant recovery of the albumin level up to normal values occurred, that, obviously, is related to a short term of observation. It can be supposed that normalisation of some biochemical blood indices is in a tight relationship with the activation of regenerative hyperplastic processes in pathologically changed liver.

Thus, CELC injection to animals with experimental cirrhosis causes an activation of reparative process in a pathologically changed organ and promotes to the normalisation of biochemical blood parameters. The revealed positive effect of CELC suspension on an animals' organism with liver cirrhosis, is probably, stipulated by the introducing of the complex of cytokines, growth factors and stage-specific proteins, capable of the recovery processes' activation.

## Литература

1. Караюлян С.Р., Сванидзе Н.Л. Усиление регенерации при обширных поражениях печени // Хирургия. – 1985. – №2. – С. 139-143.
2. Логинов А.С., Блок Ю.Е. Хронические гепатиты и циррозы печени. – М.: Медицина, 1987. – 273 с.
3. Низкие температуры при лечении хронических диффузных заболеваний печени / Б.П. Сандомирский, Н.С. Сигал, Н.В. Дубровский. – Киев: Наук. думка, 1992. – 136 с.
4. Петренко А.Ю., Оченашко О.В. Влияние препаратов эмбриональных тканей человека на интенсивность перекисного окисления липидов при остром токсическом гепатите у крыс // Пробл. криобиологии. – 2001. – №2. – С. 66-71.
5. Рубецкой А.С., Короткина Р.Н. Методика создания экспериментального цирроза у кроликов // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1960. – Т.6, №2. – С. 122-124.
6. Рябчиков О.П., Кузнецова Л.В., Назимова С.В. и др. Гормональный и клеточный состав препаратов фетальных тканей человека // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1998. – Т.126, прил.1. – С. 156-157.
7. Сигал Н.С. Деструктивно-восстановительные процессы после криовоздействий на патологически измененную печень: Автореф. дис... канд. биол. наук. – Харьков, 1989. – 16 с.
8. Солопаева И.М., Косых А.А., Жданова Т.Ф. и др. Сравнение хронической патологии печени в эксперименте и клинике / Биологическая характеристика лабораторных животных и экстраполяция на человека экспериментальных данных. – М., 1980. – С. 276-277.
9. Cremones R.V., Pereira-Filho A.A., Magalhaes R. et al. Experimental cirrhosis induced by carbon tetrachloride inhalation: adaptation of the technique and evaluation of lipid peroxidation // Arg. Gastroenterol. – 2001. – Vol.38, №1. – P. 40-47.
10. Sennikov S.V., Krysov S.V., Injelevskaya T.V. Production of cytokines by immature erythroid cells derived from human embryonic liver // Eur. Cytokine Netw. – 2001. – Vol.12, №2. – P. 274-279.

Поступило 15.10.2002

УДК 615.832.9:617:616-001/19:612.135:611.36+616.36-004

UDC 615.832.9:617:616-001/19:612.135:611.36+616.36-004

## Реакции микрогемодикуляции печени на низкотемпературное воздействие

И.В. СЛЕТА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Responses of Liver Microhaemocirculation on Low-Temperature Effect

СЛЕТА I.V.

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

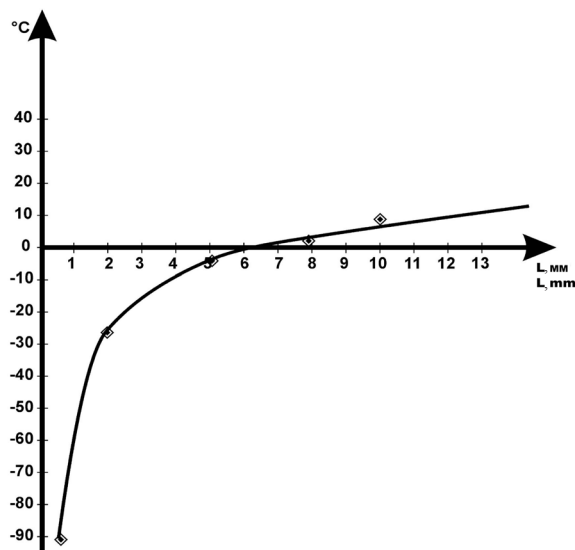
Применение в гепатологии криохирургических методов потребовало серьезных экспериментальных исследований низкотемпературного повреждения печени [1,4,5]. Одной из первичных и основных “мишеней” для реализации низкотемпературного воздействия на ткань является микрогемодикуляторное русло [3]. Цель работы - определение закономерностей формирования ответных реакций микрогемодикуляции печени при локальном криовоздействии.

Исследования проведены на 75 крысах-самцах линии Вистар. Основным методом изучения микрогемодикуляции была витальная микроскопия с помощью контактного микроскопа Люмам К-1 [2]. Транспорт

## References

1. Karagyulyan S.P., Swanidze N.P. Regeneration potentiation at extensive injuries of liver // Khirurgiya. – 1985. – N2. – P. 139-143.
2. Loginov A.S., Blok Yu. Ye. Chronic liver hepatitis and cirrhoses. – M.: Meditsina, 1987. – 273 p.
3. Low temperatures in treating of chronic diffuse diseases of liver / Sandomirsky B.P., Sigal N.S., Dubrovskiy N.V. – Kiev: Naukova dumka, 1992. – 136 p.
4. Petrenko A. Yu., Ochenashko O.V. Influence of human embryonic tissue preparations on lipids peroxidation intensity in rats acute toxic hepatitis // Probl. of Cryobiology. – 2001. – N2. – P. 66-71.
5. Rubetskoj A.S., Korotkina R.N. Method of obtaining of experimental cirrhosis in rabbits // Byul. Eksperim. Biol. i Med. – 1960. – V.6, N2. – P. 122-124.
6. Ryabchikov O.P., Kuznetsova L.V. et al. Hormonal and cellular composition of human fetal tissues preparations // Byul. Eksperim. Biol. i Med. – 1998. – V.126, Suppl.1. – P. 156-157.
7. Sigal N.S. Destruction and reparation processes after cryoeffect on pathologically changed liver: Author's thesis for obtaining the candiditates degree (biology). – Kharkov, 1989. – 16 p.
8. Solopayeva I.M. Kosykh A.A., Zhdanova T.F. et al. Comparing of liver chronic pathologies in experiment and in clinics / Biological characteristic of laboratory animals and extrapolation of experimental data for human. – Moscow, 1980. – P. 276-277.
9. Cremones R.V., Pereira-Filho A.A., Magalhaes R. et al. Experimental cirrhosis induced by carbon tetrachloride inhalation: adaptation of the technique and evaluation of lipid peroxidation // Arg. Gastroenterol. – 2001. – Vol.38, №1. – P. 40-47.
10. Sennikov S.V., Krysov S.V., Injelevskaya T.V. Production of cytokines by immature erythroid cells derived from human embryonic liver // Eur. Cytokine Netw. – 2001. – Vol.12, №2. – P. 274-279.

Accepted in 15.10.2002



**Рис. 1.** Распределение минимальных температур в зависимости от удаления от центра криовоздействия:  $\blacklozenge$  – экспериментальные значения

**Fig. 1.** Distribution of minimal temperatures depending on the distance from the center of cryoeffect:  $\blacklozenge$  - experimental values

белков в печени изучали при внутривенном введении глобулина, меченного изотиоцианатом флюоресцеина (ФИТЦ). Криовоздействие на печень осуществляли аппликатором с диаметром наконечника 1,5 мм и температурой на поверхности  $-93^{\circ}\text{C}$  в течение 2 мин.

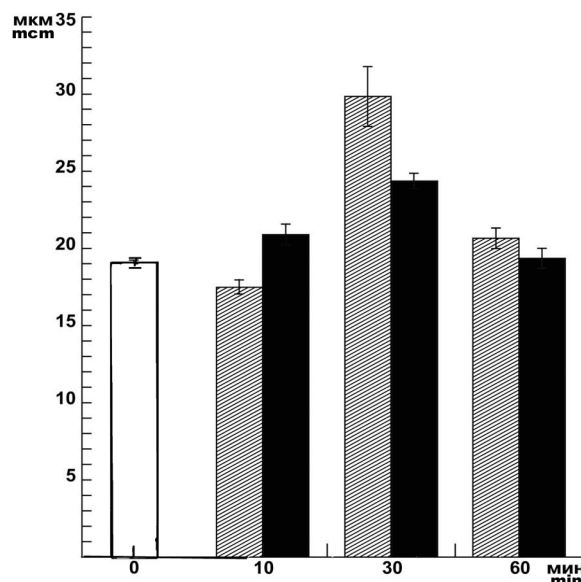
В результате анализа данных термометрии в печени после криовоздействия было выделено 3 зоны: I - зона оледенения (температура от  $-30^{\circ}\text{C}$  в центре до  $-6^{\circ}\text{C}$  на границе); II – зона охлаждения или пограничная зона (температура от  $-6$  до  $0^{\circ}\text{C}$ ); III – зона гипотермии с температурой выше  $0^{\circ}\text{C}$ ) (рис. 1).

Криовоздействие вызывало кратковременный спазм всех элементов микрогемодикуляторного русла, сменяющийся их продолжительной дилатацией (рис.2).

Сопоставление результатов термометрии и биомикроскопических исследований показало, что только в зоне I происходили необратимые нарушения микрососудов и формирование крионекроза. В связи с полным отсутствием кровотока меченый ФИТЦ-глобулин не обнаруживался.

В пограничной зоне охлаждение ткани ниже  $0^{\circ}\text{C}$  вызывало микрогемодикуляторные изменения, соответствующие острой фазе воспалительного процесса, что подтверждалось нарушением сосудисто-тканевой проницаемости. В первые минуты после криовоздействия меченый ФИТЦ-глобулин проникал в паренхиматозные клетки, в норме непроницаемые для белка. Через 1 ч. после криовоздействия наблюдалась максимальная интенсивность свечения пограничной зоны (рис. 3), через 3 ч. – четкое разграничение зоны ишемического некроза и участков печени, кровотока в которых сохранялся. Однако около 30% синусоидов в этой зоне по-прежнему затромбированы. Через 6 ч после криовоздействия на печень в большинстве микрососудов пограничной зоны кровотока восстанавливался (рис.4). Через 1 сут кровотока в печени за пределами зоны некроза мало отличался от исходного состояния (рис.5)

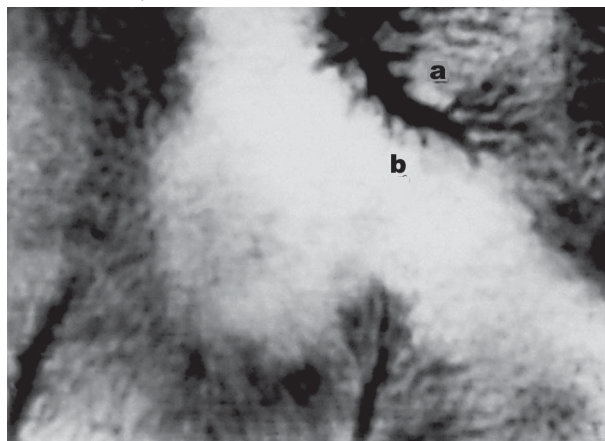
Локальное криовоздействие на печень не оказывало необратимого и продолжительного влияния на периферийные участки органа (рис.6).



**Рис. 2.** Изменение диаметров терминальных печеночных венул после локального криовоздействия:

- $\square$  - до криовоздействия;
- $\square$  - пограничная зона;
- $\blacksquare$  - зона, удаленная от центра криовоздействия на 10 мм.

**Fig. 2.** Changes of the diameters of liver terminal venules after a local cryodamage:  
 $\square$  - before the cryoeffect;  
 $\square$  - boundary zone;  
 $\blacksquare$  - zone, in the distance of 10 mm from the center of cryoeffect



**Рис. 3.** Распределение глобулина, меченного ФИТЦ, в печени через 1 ч после криовоздействия на печень (об.х10, ок.х7): а – зона оледенения; б – пограничная зона.

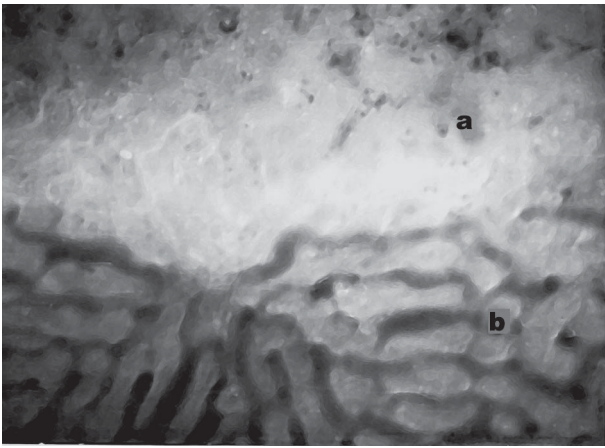
**Fig. 3.** Distribution of FITC labeled globulin in liver in 1 hr after the cryoeffect on liver (magnification: objective x10, ocular tube x7): a – freezing zone; b – boundary zone

applicator with 1,5mm tip and the temperature in the surface of  $-93^{\circ}\text{C}$ .

As a result of the analysis for thermometry data in liver after the cryoeffect 3 zones were notable: I – freezing zone (temperature from  $-30^{\circ}\text{C}$  in the centre up to  $-6^{\circ}\text{C}$  on the border); II – cooling (boundary) zone (temperature from  $-6^{\circ}\text{C}$  up to  $0^{\circ}\text{C}$ ); III – hypothermia zone with the temperature higher than  $0^{\circ}\text{C}$  (Fig. 1).

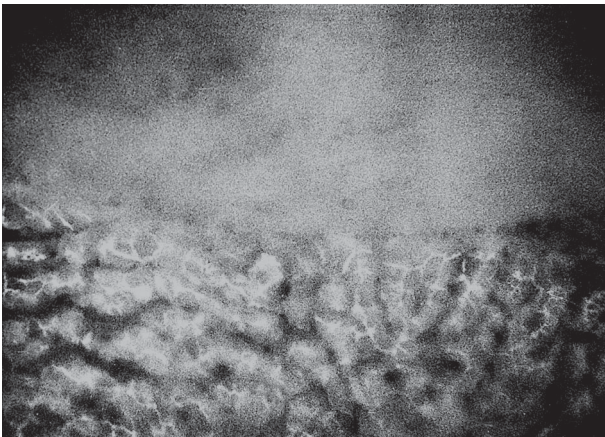
Cryoeffect caused a short-term spasm of all the elements of microhaemodicyulatory flow, followed by their prolonged dilatation (Fig. 2).

Comparison of the thermometry and biomicroscopic results demonstrated, that only in zone I the irreversible



**Рис. 4.** Граница зоны крионекроза через 6 ч после криоповреждения нормальной печени крысы (об.х25, ок.х7): а – зона оледенения; б – пограничная зона.

**Fig. 4.** Boundary of cryonecrosis zone in 6 hrs after a cryoeffect on rat liver (magnification: objective x25, ocular tube x7): a – freezing zone; b – boundary zone.



**Рис. 5.** Граница зоны крионекроза через 1 сут после криовоздействия на печень крысы (об.х20, ок.х7).

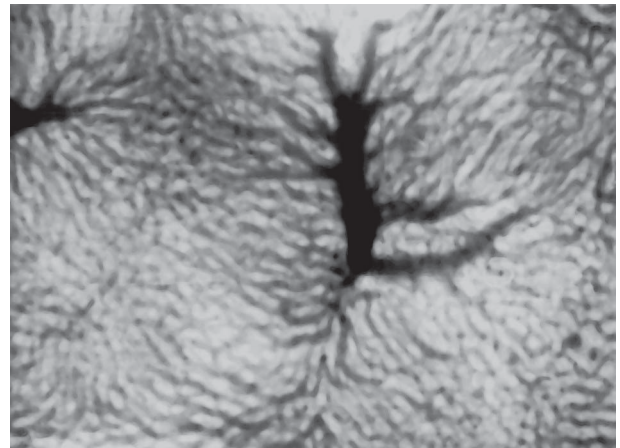
**Fig. 5.** Boundary of cryonecrosis zone in 1 day after a cryoeffect on rat liver (magnification: objective x20, ocular tube x7).

Таким образом, прижизненное наблюдение влияния дозированного локального криовоздействия на печень экспериментальных животных позволило ранжировать зависимость местных микрогемодициркуляторных реакций от времени и глубины охлаждения, ограничить значащие температурные зоны и установить главные направления патоморфоза в них.

#### Литература

1. *Парамонова Л.М.* Криохирургия печени в эксперименте. // Достижения криомедицины / Межд. симпозиум (С.-Петербург, 7-8 июня 2001). – СПб, 2001. – С. 147-150.
2. *Чернух А.М., Александров П.Н., Алексеев О.В.* Микроциркуляция. – М.: Медицина, 1984. – 489 с.
3. *Шафранов В.В., Цыганов Д.И., Виссарионов В.А. и др.* Криохирургия – теория и практика // Мед. криология: Сб. науч. тр. Вып. 1. – Н. Новгород, 2001. – С. 183-192.
4. *Gilbert J.C., Rubinsky B., Wong S.T. et al.* Temperature determination in the frozen region during cryosurgery of rabbit liver using MR image analysis // Magn. Reson. Imaging. – 1997. – Vol. 15, N6. – P. 657-667.
5. *Rubinsky B., Lee C.Y., Bastacky J., Onik G.M.* The process of freezing and the mechanism of damage during hepatic cryosurgery // Cryobiology. – 1990. – 27. – P. 85-97.

Поступило 8.10.2002



**Рис. 6.** Микрогемодициркуляторное русло участка, удаленного от зоны крионекроза на 15 мм через 1 сут после криовоздействия на печень крысы (об.х10, ок.х7)

**Fig. 6.** Microhaemodynamic flow in the distance of 15 mm from a cryonecrosis zone in 1 day after a cryoeffect on rat liver (magnification: objective x25, ocular tube x7).

failures in microvessels and a cryonecrosis' formation were occurred. Due to complete absence of the blood flow no labeled FITC-globulin was found.

In the boundary zone a tissue cooling lower than 0°C caused microhaemodynamic changes, corresponding to an acute phase of inflammatory process, that was confirmed by the failure of vascular-tissue permeability. Within first minutes after the cryoeffect labeled FITC globulin penetrated into parenchymatous cells, in the norm impermeable for protein. In 1 hr after cryoeffect the maximum intensity in a boundary zone the lightening was observed, in 3 hrs there was noted a clear demarcation of ischemic necrosis zone and liver sites, blood flow of which has remained. However about 30% of sinusoids in this zone were still thrombed. In 6 hrs after the cryoeffect on liver in the majority of microvessels in a boundary zone the blood flow was recovered (Fig. 4). In 1 day the blood flow in liver slightly differed from the initial state (Fig. 5).

Local cryoeffect on liver did not cause irreversible and prolonged effect on peripheral sites of an organ.

Thus, a vital observation of the action of a dosed local cryoeffect on liver of experimental animals allowed to determine the dependence of local microhaemodynamic responses on the time and depth of cooling, as well as to limit significant temperature zones and establish main directions of pathomorphosis in them.

#### References

1. *Paramonova L.M.* Liver cryosurgery in experiment // Achievements of cryomedicine/ International Symposium (St.Petersburg, June 7-8, 2001). – St.Petersburg, 2001. – P. 147-150.
2. *Chemukh A.M., Aleksandrov P.N., Alekseyev O.V.* Microcirculation. – M.: Medicine, 1984. – 489 p.
3. *Shafranov V.V., Tsyganov D.I., Vissarianov V.A. et al.* Cryosurgery – theory and practice // Med. Cryology: Coll. of Research Works. Issue 1. – N. Novgorod, 2001. – P. 183-192.
4. *Gilbert J.C., Rubinsky B., Wong S.T. et al.* Temperature determination in the frozen region during cryosurgery of rabbit liver using MR image analysis // Magn. Reson. Imaging. – 1997. – Vol. 15, N6. – P. 657-667.
5. *Rubinsky B., Lee C.Y., Bastacky J., Onik G.M.* The process of freezing and the mechanism of damage during hepatic cryosurgery // Cryobiology. – 1990. – 27. – P. 85-97.

Accepted in 8.10.2002

## Влияние молозива коров на динамику метаболических нарушений при экспериментальном сахарном диабете

С.Е. ГАЛЬЧЕНКО, И.В. БЕЛОЧКИНА, Е.С. ГАЛЬЧЕНКО

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Effect of Bovine Colostrum on the Dynamics of Metabolic Disorders at Experimental Diabetes mellitus

GALCHENKO S.E., BELOCHKINA I.V., GALCHENKO E.S.

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

Сахарный диабет (СД) - одно из наиболее полисиндромных заболеваний, характеризуется тяжелыми осложнениями, приводящими к инвалидности и смертности больных. Ежегодно число больных СД увеличивается на 6-10%. При данном заболевании инсулиновая недостаточность детерминирует обменные и гормональные нарушения, включая развитие специфических диабетических осложнений, являющихся следствием гипергликемии, окислительного стресса, связанного с нарушением углеводного обмена, и т.д. [5].

Проблема предупреждения СД и снижения его проявлений требует поиска новых средств лечения, а также средств, которые могли бы оказывать профилактическое и протекторное действие.

Лиофилизированное молозиво коров - препарат, используемый для профилактики СД, компенсации его проявлений и нормализации метаболизма клеток, тканей и всего организма. В молозиве содержатся биологически активные вещества, которые нормализуют иммунный ответ организма, в том числе и при аутоиммунных заболеваниях [6]. Такие ростовые гормоны, находящиеся в нем, как гонадотропин, эпидермальный ростовой фактор, фактор роста фибробластов и т.д. принимают участие в построении и регенерации гладкой мускулатуры, костей, нервной и хрящевой ткани, регуляции уровня сахара в крови [8]. Лактоферрин, входящий в состав молозива, участвует в регулировании пролиферации клеток, иммунного ответа, является эффективным хелатором железа и антиоксидантом [2, 7], может препятствовать развитию нарушений, связанных с активацией перекисных процессов при СД.

Целью данной работы было изучение эффективности лиофилизированного молозива коров при экспериментальном СД.

В работе использованы половозрелые крысы-самцы линии Вистар массой 180-230 г. После предварительного 24 - часового голодания при свободном доступе к воде крысам вводили аллоксан - тригидрат подкожно однократно в дозе 130 мг/кг веса животного. До введения аллоксана часть крыс в течение месяца ежедневно получала молозиво коров (по 100 мг сухого вещества каждая) с показателями качества, приведенными в [4]. Эта же группа крыс продолжала получать молозиво на протяжении всего эксперимента. Лиофилизированное молозиво регидратировали и вводили перорально с помощью зонда. Степень выраженности гликемии и интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в плазме крови и гомогенате печени крыс изучали на

Diabetes mellitus (DM) is one of polysyndrome diseases, characterised by severe complications, resulting in the patients' disability and death. Every year the number of DM patients increases by 6-10%. Insulin insufficiency at this disease determines metabolic and hormonal impairments, including the development of specific diabetic complications, caused by hyperglycaemia, oxidative stress, related to the impairment of hydrogen metabolism etc. [5]

The problem for DM preventing and reducing its manifestations requires the search of new treatment means, as well as ones, which could manifest prophylactic and protective effect.

Lyophilised bovine colostrum is the preparation, used for DM prophylactics, compensation of its manifestations and normalisation of metabolism in cells, tissues and the whole organism. Colostrum comprises biologically active substances, normalising immune response of an organism, as well as at autoimmune diseases [6]. Such growth hormones, being in colostrum as gonadotropin, epidermal growth factor, fibroblast growth factor etc, participate in the structure and regeneration of smooth muscles, bones, nerve and cartilage tissue, regulation of sugar level in blood [8]. Lactoferrin as a part of colostrum, participates in the regulation of cell proliferation, immune response, and is an efficient iron chelator and antioxidant [2, 7] and can prevent the development of disorders, related to the activation of peroxidative processes at DM.

The aim of the work was to study the efficacy of lyophilized bovine colostrum at experimental DM.

In the work we have used 180-230g<sup>7</sup> mature Wistar male-rats. Following the preliminary 24-hrs' starvation with a free access to water the rats were subjected to a single subcutaneous injection of alloxan-trihydrate in the dose of 130 mg/kg of an animal's weight. Before an alloxan injection colostrum was given to one group of rats (100 mg of a dry substance for each animal) with quality indices, presented in the paper [4].

The same group of rats continued feeding with colostrum during the whole experiment. Lyophilised colostrum was rehydrated and perorally injected by probe. Manifestation degree of glycaemia and intensity of lipid peroxidation (LPO) in blood plasma and liver homogenate were studied to the 7, 15, 30<sup>th</sup> days. The blood was taken from a tail vein. Rats were decapitated, preliminarily treated with ether. Glucose level was determined in blood serum by chromoxygenase method [3]. LPO intensity was calculated on an initial, spontaneous, Fe<sup>2+</sup> - and ascorbate-induced levels of TBA-active products (TBAAP) in blood

7-е, 15-е и 30-е сутки. Кровь брали из хвостовой вены. Крыс умерщвляли декапитацией, предварительно усыпив их эфиром. Уровень глюкозы определяли в сыворотке крови хромооксигеназным методом [3]. Интенсивность ПОЛ рассчитывали по начальному, спонтанному, Fe<sup>2+</sup>- и аскорбат-индуцированному уровню ТБК-активных продуктов (ТБКАП) в плазме крови и гомогенате печени [1]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

При моделировании СД у крыс было установлено, что уровень глюкозы в крови у животных с СД, не получавших молозива, на 7-е сутки превышал норму в 2,3, а на 15-е - в 3,5 раза, к 30-м суткам он несколько снижался, однако оставался значительно выше нормы. У животных с СД, которые получали молозиво в течение месяца до введения аллоксана, уровень гликемии был ниже, чем у животных с СД, не получавших его, и составил на 7-е сутки 170% от нормы.

В крови крыс экспериментальной группы концентрация глюкозы увеличивалась к 15-м суткам, как и у крыс, не получавших молозива, однако к 30-м суткам отмечалось ее снижение до 190% по сравнению с 280% нормы у крыс, которым не вводили молозиво. При исследовании динамики глюкозы в крови этих же животных при глюкозной нагрузке получены аналогичные результаты.

Известно, что СД сопровождается активацией перекисных процессов и накоплением в тканях и крови конечных продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Максимальная концентрация ТБКАП наблюдается в крови крыс с СД, не получавших молозива, на 15-е сутки с некоторым снижением к 30-м суткам, однако их уровень остается достоверно выше ( $p < 0,05$ ) контрольного значения. При предварительном применении молозива уровень ТБКАП на 7-е сутки хотя и превышает контрольное значение, но достоверно ниже ( $p < 0,05$ ) уровня, характерного для крыс, не получавших его. К 15-м суткам этот показатель увеличивается, но к 30-м возвращается к значению, характерному для контрольных животных. Повышенный уровень ПОЛ при СД характерен не только для плазмы крови, но и для других тканей, в частности для печени (таблица).

Начальный, спонтанный и Fe<sup>2+</sup>-индуцированный уровень ТБКАП в гомогенате печени крыс, не получавших молозива, во все сроки наблюдения превышает контрольный уровень в 1,4 - 1,6 раза. Аскорбат-индуцированный уровень на 7-е сутки превышает контроль в 2,2 раза, а к 30-м суткам несколько снижается и превышение составляет 1,9 раза. Предварительное введение подопытным животным

plasm and liver homogenate [1]. Statistical processing of the results obtained was performed using Student's t-criterion.

When modeled DM in rats it was established that glucose level in the blood of animals with DM, which have not been treated with colostrum, to the 7<sup>th</sup> day exceeded the norm by 2.3 times, to the 15<sup>th</sup> day this index made 3.5 times, and by the 30<sup>th</sup> day it slightly decreased, however it remained significantly lower than a norm. In animals with DM, which have been treated with colostrum during 1 month before an alloxan injection, the glycaemia level was lower, than in animals with DM without the treatment with colostrum and made 170% of the norm to the 7<sup>th</sup> day.

In rats' blood of experimental group glucose concentration has increased to the 15<sup>th</sup> day, as well as in animals, which have not been treated with colostrum, however to the 30<sup>th</sup> day there was observed its reduction down to 190% comparing to normal 280% in rats without the colostrum introduction. When studying the glucose dynamics in blood of these animals with glucose loading we have obtained the same results.

It is known that DM is accompanied by the activation of peroxidative processes and accumulation in tissues and blood of final LPO products, reacting with thiobarbituric acid. The maximum TBA concentration is seen in rats' blood with DM without the colostrum treatment to the 15<sup>th</sup> day with a slight reduction to the 30<sup>th</sup> day, however their level has remained significantly higher ( $p < 0.05$ ) than the control values. At preliminary colostrum application the TBAAPs level to the 7<sup>th</sup> day is higher than the control values, but it is considerably lower ( $p < 0.05$ ) than the level, characteristic for the rats without the treatment by colostrum. To the 15<sup>th</sup> day this index increases, but to the 30<sup>th</sup> day it returns to the value, characteristic for the control animals. An increased LPO level during DM is characteristic not only for blood plasm, but for other tissues as well, in particular, liver (table).

Уровень ТБКАП в печени крыс, (нмоль/г ткани)  
The level of TBAAP in rat liver, (nM/g of tissue)

Уровень ТБКАП TBAAP level	Срок наблюдения, сут Terms of observation, days	Условия эксперимента Experiment conditions		
		Контроль The control	СД DM	СД+молозиво DM+colostrum
Начальный Initial	7	3,9±0,3	5,4±0,4	4,2±0,3 <sup>1,2</sup>
	30	3,8±0,2	5,2±0,3	4,2±0,3 <sup>1,2</sup>
Спонтанный Spontaneous	7	4,7±0,3	6,7±0,5	5,9±0,3 <sup>1,2</sup>
	30	4,4±0,2	6,5±0,4	5,3±0,4 <sup>2</sup>
Fe <sup>2+</sup> -индуцированный Fe <sup>2+</sup> - induced	7	5,4±0,4	8,7±0,7	7,3±0,5 <sup>2</sup>
	30	5,8±0,5	8,1±0,4	6,9±0,5 <sup>1,2</sup>
Аскорбат-индуцированный Ascorbate-induced	7	9,2±0,6	20,1±1,8	15,1±1,3 <sup>2</sup>
	30	9,4±0,7	18,4±1,1	12,2±1,0 <sup>2</sup>

**Примечания:**

<sup>1</sup> – различия недостоверны по сравнению с контролем,  $p > 0,05$ ;

<sup>2</sup> – различия достоверны по сравнению с тем же сроком длительности заболевания СД,  $p < 0,05$

**Notes:**

<sup>1</sup> – differences are statistically different comparing to the control,  $p > 0,05$

<sup>2</sup> – differences are statistically true comparing to the same term of the DM pathology duration,  $p < 0.05$

молозива оказывает протекторный эффект, уменьшая активацию ПОЛ в печени, и в этом случае уровень ТБКАП составляет 0,7-0,9 от величины соответствующих показателей животных, которые не получали молозива. При этом начальный уровень ТБКАП не отличается от контроля ( $p < 0,05$ ) и на 7-е, и 30-е сутки наблюдения.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод, что лиофилизированное молозиво коров обладает защитным эффектом при экспериментальном СД и снижает уровень метаболических нарушений в динамике развития и протекания данной патологии.

### Литература

1. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело.– 1988.– №11.– С. 41-43.
2. Белизи С., Назарова И.А., Климова И.А. и др. Антиоксидантные свойства лактоферрина из женского молока // Бюл. эксперим. биол. и мед.– 1999.– №5.– С. 523-525.
3. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В.В. Меньшикова.– М.: Медицина, 1987.– С. 230-234.
4. Сандомирский Б.П., Гальченко С.Е., Гальченко Е.С. Влияние температуры и времени хранения на качество молозива коров // Пробл. криобиологии.– 2001.– №1.– С. 60-64.
5. Экспериментальное моделирование сахарного диабета для изучения специфического эффекта новых антидиабетических веществ. Метод. рекомендации / Сост. В.В.Полторак и др.– Харьков: НИИ эндокринологии и химии гормонов, 1991.– 20 с.
6. Klobasa F., Goel M. Comparison of freezing and lyophilizing for preservation of colostrum as a source of immunoglobulins for calves // J. Anim. Sci.– 1998.– №76.– P. 923-926.
7. Lonnerdal B., Iyers S. Lactoferrin: molecular structure and biological function // Annu. Rev. Nutr.– 1995.– №5.– P. 93-100.
8. Playford R., Macdonald C., Johnson W. Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders // Am. J. Clin. Nutr.– 2000.– №72.– P. 5-14.

Поступило 26.03.2002

An initial, spontaneous and  $Fe^{2+}$ -induced TBAAPs level in liver homogenate of non-treated with colostrum rats increases the control level by 1.4-1.6 times at all the observation terms. Ascorbate-induced level increases the control by 2.2 times to the 7<sup>th</sup> day, and to the 30<sup>th</sup> day it decreases and the exceeding makes 1.9 times. Preliminary injection of colostrum to experimental animals shows a protective effect, reducing LPO activation in liver, and in this case TBAAPs level is 0.7-0.9 of the value of corresponding indices in non-treated with colostrum animals. Thereat an initial level of TBAAPs did not differ from the control ( $p < 0,05$ ) to the 7<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> days of observation as well.

Thus, obtained data allow to conclude that lyophilised bovine colostrum possesses a protective effect during experimental DM and reduces the level of metabolic failures in the dynamics of development and course of given pathology.

### References

1. Andreeva L.I., Kozhemyakin L.A., Kishkun A.A. Modification of the method for lipid peroxides determination in a dough with thiobarbituric acid // Lab. delo.– 1988.– N11.– P. 41-43.
2. Belizi S., Nazarova I.A., Klimova I.A. et al. Antioxidative properties of lactoferrin derived from women's milk // Bull. Experim. Biol. i Med.– 1999.– N5.– P. 523-525.
3. Laboratory methods for investigation in clinics/ Ed. by Menshikov V.V.– M.:Medicine, 1987.– P. 230-234.
4. Sandomirsky B.P., Galchenko S.E., Galchenko E.S. Effect of the temperature and term of storage on the quality of bovine colostrum // Problems of Cryobiology.– 2001.– N1.– P. 60-64.
5. Experimental modeling of Diabetes mellitus for studying specific effect of new antidiabetic substances. Method. recommendations / Poltorak V.V. et al.– Kharkov: R&D Institute of Endocrinology and Chemistry of Hormones, 1991.– 20p.
6. Klobasa F., Goel M. Comparison of freezing and lyophilizing for preservation of colostrum as a source of immunoglobulins for calves // J. Anim. Sci.– 1998.– №76.– P. 923-926.
7. Lonnerdal B., Iyers S. Lactoferrin: molecular structure and biological function // Annu. Rev. Nutr.– 1995.– №5.– P. 93-100.
8. Playford R., Macdonald C., Johnson W. Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders // Am. J. Clin. Nutr.– 2000.– №72.– P. 5-14.

Accepted in 26.03.2002