

Сочетанное использование криодеструкции и ксеноэкстракта для стимуляции регенерации печени крыс с экспериментальным циррозом

UDC 615.361.36.014.41:616.36-004:612-092.4

A.A. OLEFIRENKO, L.N. TYNYNYKA, B.P. SANDOMIRSKY*

Combined Usage of Cryodestruction and Xenoextract to Stimulate Liver Regeneration in Rats With Experimental Cirrhosis

Исследовалась возможность стимуляции репаративных процессов печени при экспериментальном циррозе печени и сочетанном использовании водно-солевого ксеноэкстракта и криодеструкции. Показано, что сочетанное использование криодеструкции печени и ксеноэкстракта способствует более интенсивной стимуляции репаративных процессов в цирротически измененной печени по сравнению с криодеструкцией, в результате чего наблюдаются снижение активности аминотрансфераз, уровня билирубина, нормализация перекисных процессов и повышение концентрации альбумина в сыворотке крови крыс на фоне экспериментального цирроза печени.

Ключевые слова: экспериментальный цирроз печени, криодеструкция, аминотрансферазы, перекисное окисление липидов, альбумин, билирубин.

Досліджувалась можливість стимуляції репаративних процесів печінки при експериментальному цирозі печінки і поєднаному використанні водно-солевого ксеноекстракту і криодеструкції. Доведено, що поєднане використання криодеструкції печінки і ксеноекстракту сприяє більш інтенсивній стимуляції репаративних процесів в циротично зміненій печінці у порівнянні з криодеструкцією, що виявляється в зниженні активності аминотрансфераз, рівня білірубину, нормалізації перекисних процесів і підвищенні концентрації альбуміну в сироватці крові щурів на фоні експериментального цирозу печінки.

Ключові слова: експериментальний цироз печінки, криодеструкція, аминотрансферази, перекисне окислення ліпідів, альбумін, білірубін.

The possibility to stimulate reparative processes in liver at experimental cirrhosis and a combined usage of aqueous-saline xenoextract and cryodestruction was investigated. Combined use of liver cryodestruction and xenoextract was shown as contributing to more intensive stimulation of reparative processes in cirrhotic changed liver in comparison with cryodestruction. As a result, a decrease in aminotransferase activity, bilirubin level, the normalization of peroxide processes and increase in albumin concentration in rat blood serum at the background of experimental liver cirrhosis were observed.

Key-words: experimental liver cirrhosis, cryodestruction, aminotransferases, lipid peroxidation, albumin, bilirubin.

Цирроз печени (ЦП) – это хроническое прогрессирующее заболевание, обусловленное поражением паренхимы и стромы печени, дистрофическими изменениями печеночных клеток, диффузным развитием соединительной ткани и перестройкой печени.

Биохимически ЦП проявляется в изменении углеводного, липидного и белкового обмена, а также в нарушении показателей дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий, увеличении активности аминотрансфераз в крови и уменьшении их активности в печеночной ткани, активации перекисного окисления липидов (ПОЛ). Причинами возникновения заболевания могут быть вирусы гепатита, алкоголизм, дисфункция желчных путей, хроническая недостаточность кровообращения, токсины, лекарственные вещества, паразитарные заболевания [5, 6, 11].

Liver cirrhosis (LC) is a chronic progressing disease, stipulated by damaging of liver parenchyma and stroma, dystrophic changes in liver cells, diffusive development of connective tissue and liver rearrangement.

LC biochemical manifestations are as follows: change in carbohydrate, lipid and protein metabolism, as well as disorder in indices of respiration and oxidative phosphorylation of mitochondria, aminotransferase activity increase in blood and its reduction in liver tissue, activation of lipid peroxidation (LPO). This disease could be caused by hepatitis viruses, alcoholism, biliary tracts dysfunction, chronic insufficiency of blood circulation, toxins, medicines, parasitic diseases [5, 6, 11].

For cirrhosis treatment there are applied such preparations with hepatoprotective effect as Essentiale, Urolesanum, Galstena, Carsil etc. [6], contributing to stabilization of inflammatory process in liver, elimination

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 372-74-35, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 372 7435, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

рубина (мкмоль/л) в сыворотке крови крыс – по тест-системе “Симко” (Львов). Уровень перекисного окисления (нмоль/мл) в сыворотке крови крыс оценивали по количеству продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [2].

Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

Любое повреждение печеночной паренхимы сопровождается нарушением метаболических функций печени, которое отражается на содержании соответствующих метаболитов в сыворотке крови. Чаще всего выраженность метаболических нарушений в сыворотке крови коррелирует со степенью повреждения органа. В результате локальной криодеструкции в печени образуется ограниченная зона некроза, а окружающий ее воспалительный барьер вызывает определенные метаболические реакции, интенсивность которых существенно отличается у нормальной и цирротически измененной печени. Локальная криодеструкция нормальной печени вызывает кратковременные и умеренные нарушения ее функциональной активности, в то время как локальная криодеструкция цирротически измененной печени усугубляет характерные для этого заболевания метаболические сдвиги [6, 10].

У животных после введения CCl_4 наблюдали характерные проявления ЦП (малоподвижность, частичная утрата волосяного покрова), у некоторых животных – асцит, изменение структуры и формы органа (печень мелкобугристая с закругленными краями).

the content of corresponding metabolites in blood serum. The manifestation rate of metabolic disorders in blood serum mostly correlates with the degree of organ damage. As a result of local cryodestruction a limited necrotic area is formed, and a surrounding it inflammatory barrier causes certain metabolic reactions, which intensity significantly differs in normal liver from that in cirrhotically changed one. Local cryodestruction of normal liver causes short-time and moderate disorders in its functional activity, meanwhile the local cryodestruction of cirrhotically changed liver aggravates typical for this disease metabolic shifts [6, 10].

In animals after CCl_4 introduction there were observed typical for LC manifestations (low mobility, partial loss of hair-covering), in some animals there were ascites, change in organ's structure and shape (liver was small-tuberous with rounded edges).

Cirrhotic changes in rat liver were accompanied with an increase in aminotransferase activity (Fig. 1). At the same time to the 1st day after CCl_4 introduction the alaninaminotransferase (AlAT) activity was 5 times higher than the norm, and the aspartataminotransferase (AsAT) one was twice increased (Fig. 2). Differences in dynamics of aminotransferase activity augmentation are related to their intracellular localization. AlAT is cytosol enzyme, therefore any damages of cell membrane lead to its release out of cell. AsAT release require more serious damages of cell and intracellular components, since its 50% are localized in mitochondria [5, 7].

Change in aminotransferase activity in blood serum of IInd and IIIrd groups of animals is similar (see Fig. 1, 2). Differences in a change of studied index to the 3rd day are not statistically significant in comparison with

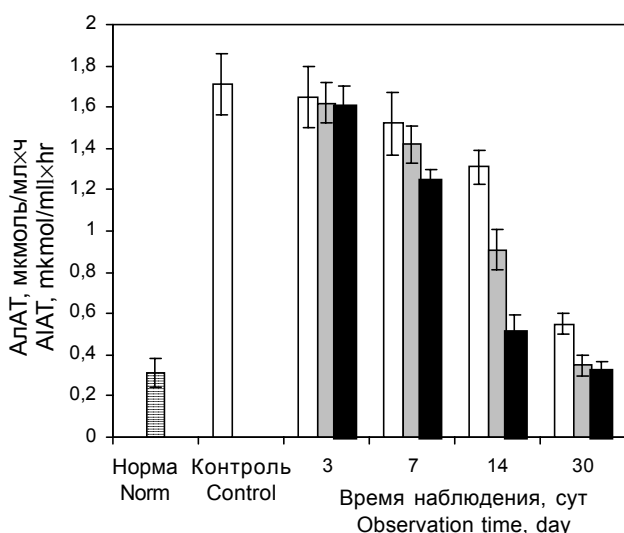


Рис. 1. Активность АлАТ в сыворотке крови крыс: □ – норма; □ – контроль; ■ – криодеструкция; ■ – криодеструкция и ксеноэкстракт.

Fig. 1. AlAT activity in rat blood serum: □ – norm; □ – control; ■ – cryodestruction; ■ – cryodestruction and cryoextract.

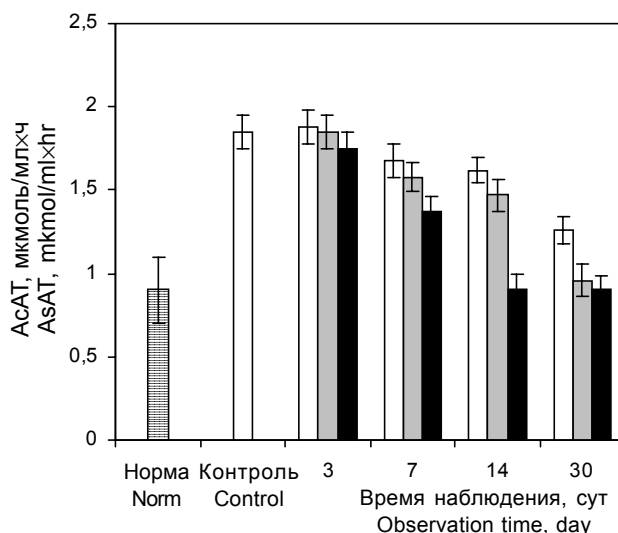


Рис. 2. Активность АсАТ в сыворотке крови крыс: □ – норма; □ – криодеструкция; ■ – контроль; ■ – криодеструкция и ксеноэкстракт.

Fig. 2. AsAT activity in rat blood serum: □ – norm; □ – control; ■ – cryodestruction; ■ – cryodestruction and cryoextract.

Цирротические изменения печени крыс сопровождались увеличением активности аминотрансфераз (рис. 1). При этом на 1-е сутки после введения CCl_4 активность аланаминотрансферазы (АлАТ) была в 5 раз выше нормы, а аспартатаминотрансферазы (АсАТ) – в 2 раза (рис. 2). Различия в динамике повышения активности аминотрансфераз связаны с их внутриклеточной локализацией. АлАТ – это цитозольный фермент, поэтому при любых повреждениях клеточной мембраны он может легко высвобождаться из клетки. Для высвобождения АсАТ необходимы более сильные повреждения клетки и внутриклеточных компонентов, поскольку 50% ее локализовано в митохондриях [5, 7].

Изменение активности аминотрансфераз в сыворотке крови животных II и III групп сходно (см. рис. 1, 2). Различия в изменении исследуемого показателя на 3-и сутки недостоверны по сравнению с контролем. Однако на 7-е сутки получены достоверные различия в сторону уменьшения активности аминотрансфераз в сыворотке крови животных III группы по сравнению с контролем. Тогда как у животных II группы исследуемый показатель не отличался от группы контроля, хотя и наблюдалась тенденция к его понижению. На 14-е сутки показатель активности аминотрансфераз был достоверно ниже контрольного, на 30-е сутки наблюдалось самопроизвольное восстановление уровня аминотрансфераз почти до нормы. По сравнению с III группой животных исследуемый показатель имел тенденцию к повышению, однако его различия недостоверны. Полученные данные

the control. However to the 7th day there were obtained statistically significant differences towards a decrease in aminotransferase activity in blood serum of IIIrd group of animals in comparison with the control. Meanwhile in the animals of IInd group the studied index did not differ from the control group, although the tendency to its reduction was observed. To the 14th day the index of aminotransferase activity was statistically and significant lower than the control one, to the 30th day a spontaneous recovery of aminotransferase level up to the norm was observed. In comparison with the IIIrd group of animals the studied index had the tendency to augment, but its differences were not statistically significant. The data obtained correlate with those reported [10]. Thus, the changes in blood biochemical composition under the effect of local cryodestruction were characterised with bilirubinemia, reduction of total protein amount with signs of dysproteinemia, manifested in a decrease in albumin fraction content. Along with this there was the augmentation of transaminase activity. All indices were recovered to the norm by the 20th day.

Thus, in IIIrd group of animals aminotransferase level recovered more rapidly than in those for Ist and IInd groups.

When studying the index of peroxide processes intensity in serum blood of LC rats using xenoextract at the background of cryodestruction we observed that the level of TBA-active products (TBA AP) to the 7th, 14th and 30th days was statistically and significantly lower, than in Ist and IInd groups of animals (Fig. 3). Meanwhile the LPO level increased almost thrice in comparison with the norm to the 1st day after CCL_4

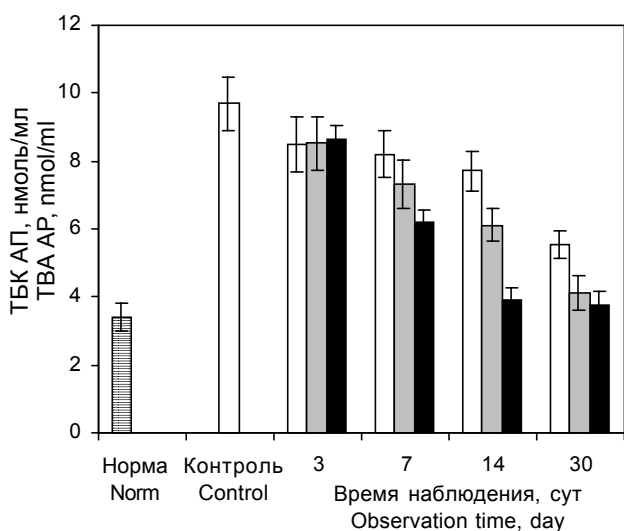


Рис. 3. Интенсивность перекисных процессов в сыворотке крови крыс: □ – норма; □ – контроль; ■ – криодеструкция; ■ – криодеструкция и ксеноэкстракт.

Fig. 3. Peroxide process intensity in rat blood serum: □ – norm; □ – control; ■ – cryodestruction; ■ – cryodestruction and cryoextract.

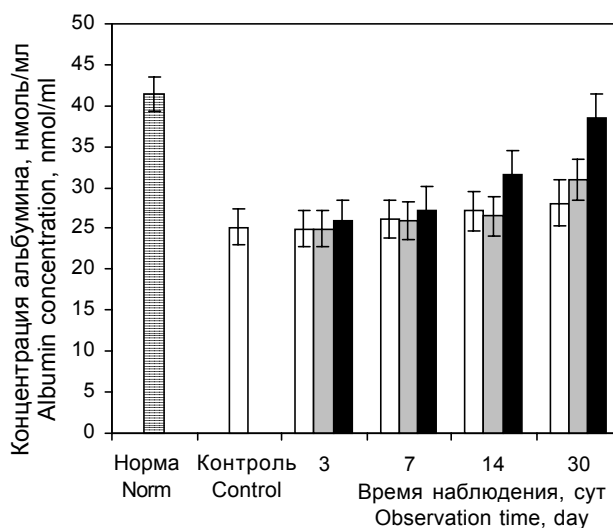


Рис. 4. Концентрация альбумина в сыворотке крови крыс: □ – норма; □ – контроль; ■ – криодеструкция; ■ – криодеструкция и ксеноэкстракт.

Fig. 4. Albumin concentration in rat blood serum: □ – norm; □ – control; ■ – cryodestruction; ■ – cryodestruction and cryoextract.

согласуются с литературными [10]. Так, изменения биохимического состава крови под влиянием локальной криодеструкции характеризовались билирубинемией, снижением количества общего белка с явлением диспротеинемии, выражавшейся в уменьшении содержания альбуминовой фракции. Наряду с этим повышалась активность трансаминаз. Все показатели возвращались к норме на 20-е сутки.

Таким образом, у животных III группы уровень аминотрансфераз восстанавливался быстрее, чем у животных I и II групп.

Исследуя показатель интенсивности перекисных процессов в сыворотке крови крыс с ЦП при использовании ксеноэкстракта на фоне криодеструкции, наблюдали, что уровень ТБК-активных продуктов (ТБК АП) на 7, 14 и 30-е сутки был достоверно ниже, чем у животных I и II групп (рис. 3). Тогда как уровень ПОЛ повышался почти в 3 раза по сравнению с нормой на 1-е сутки после введения CCl_4 и имел тенденцию к самопроизвольному восстановлению на 30-е сутки, однако различия по сравнению с нормой достоверны.

Активация перекисных процессов и структурно-функциональные изменения в клеточных мембранах важны в патогенезе хронических гепатитов различной этиологии и ЦП. Установлено, что концентрация ТБК АП в плазме крови и эритроцитах прямо пропорциональна тяжести патологического процесса [1]. Причем курс лечения больных с аналогичными патологиями незначительно влиял на уровень продуктов ПОЛ. Причиной этого может быть тот факт, что при ишемии и гипоксии клеток, которые развиваются в гепатоцитах при активации воспалительного процесса, в клетках накапливаются метаболиты (лактат, аденозинмонофосфат и т.д.), которые при восстановлении нормальной реоксигенации могут способствовать интенсификации процессов ПОЛ.

По влиянию криодеструкции на интенсивность ПОЛ в сыворотке крови крыс на фоне экспериментального ЦП можно сделать вывод, что уровень ТБК АП в перекисных процессах практически не отличался от контроля, хотя и имел тенденцию к понижению. Очевидно, криодеструкция может способствовать активации этих процессов в крови и печени животных.

Развитие патологии печени приводит к нарушению белково-синтетической и экскреторной функций, для быстрой оценки которых определяют концентрацию альбумина, образующегося в гепатоцитах, и билирубина в сыворотке крови. Концентрация альбумина в сыворотке крови крыс контрольной группы ниже в 1,7 раза по сравнению с его концентрацией у здоровых животных

introduction and had the tendency to spontaneous recovery to the 30th day, but the differences were statistically significant in comparison with the norm.

Activation of peroxide processes and structural-functional changes in cell membranes are important in pathogenesis of chronic hepatitis of various etiology and LC. TBA AP concentration in blood plasma and erythrocytes was established to be directly proportional to pathological process severity [1]. Moreover the treatment course of patients with the same pathologies insignificantly affected the level of LPO products. It can be caused by metabolites (lactate, adenosin monophosphate etc.) accumulation in cells under ischemia and hypoxia of cells, developing in hepatocytes during inflammatory process activation. Metabolites can contribute to LPO processes intensification during normal re-oxygenation recovery.

Upon cryodestruction effect on LPO intensity in rat blood serum at the background of experimental LC we can conclude, that TBA AP level in peroxide processes did not practically differ from the control, although had the tendency to reduction. Cryodestruction can evidently contribute to these processes activation in animals' blood and liver.

Development of liver pathology results in a disorder of protein-synthetic and excretory functions, for which rapid evaluation one determines concentration of albumin, formed in hepatocytes and that of bilirubin in blood serum. Albumin concentration in blood serum of rats of control group was 1.7 times lower in comparison with its concentration in healthy animals (Fig. 4). In IIIrd group of animals normal level of albumin in rat

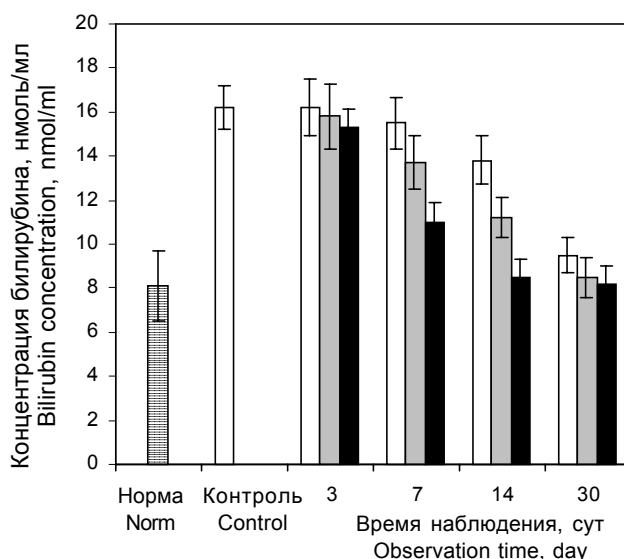


Рис. 5. Концентрация билирубина в сыворотке крови крыс: □ – норма; □ – контроль; ■ – криодеструкция; ■ – криодеструкция и ксеноэкстракт.

Fig. 5. Bilirubin concentration in rat blood serum: □ – norm; □ – control; ■ – cryodestruction; ■ – cryodestruction and cryoextract.

(рис. 4). У животных III группы нормальный уровень альбумина в сыворотке крови восстановился на 30-е сутки, а у животных остальных групп он был ниже нормы.

Концентрация билирубина в сыворотке крови крыс с ЦП в 2 раза выше нормы (рис. 5). У животных III группы нормальный уровень билирубина в сыворотке крови восстанавливался быстрее, чем у животных остальных групп. Исследуемый показатель на 7-е сутки достоверно отличался от показателя остальных групп в сторону понижения концентрации билирубина, однако до нормы он восстановился на 14-е сутки. Концентрация билирубина в сыворотке крови крыс всех исследуемых групп самопроизвольно восстанавливалась до нормы на 30-е сутки.

Выводы

На основании полученных результатов было показано, что сочетанное использование криодеструкции печени и ксеноэкстракта является более мощным стимулятором репаративных процессов в цирротически измененной печени по сравнению с использованием криодеструкции, что проявляется в снижении активности аминотрансфераз, уровня билирубина, нормализации перекисных процессов и повышении концентрации альбумина в сыворотке крови крыс на фоне экспериментального цирроза печени.

Авторы выражают благодарность канд. биол. наук Гальченко С.Е. и канд. биол. наук Слете И.В. за предоставление ксеноэкстракта и помощь в проведении эксперимента.

Литература

1. Абрагамович О.О., Грабовська О.І., Терлецька О.І. та інші. Процеси ліпідної пероксидації при хронічних ураженнях печінки // Мед. хімія.– 2000.– Т.2, №1.– С.1-8.
2. Андреева Л.Н. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело, 1988.– №11.– С.41-43.
3. Бызов В.В., Высеканцев И.П., Гальченко С.Е., Сандомирский Б.П. Опыт применения эндотрахеального введения экстракта криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки в комплексном лечении больных с гнойными процессами в легких // Пробл. криобиологии.– 2001.– №3.– С. 87-88.
4. Гальченко С.Е., Белочкіна І.В., Тининіка Л.М., Сандомирський Б.П. Вплив екстрактів підшлункової залози і печінки свиней на щурів з експериментальними патологіями відповідних органів // Трансплантологія.– 2003.– Т. 4, №1.– С. 68-70.
5. 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.

blood serum recovered to the 30th day, and it was lower than the norm for rest of animals.

Bilirubin concentration in LC rats' blood serum was twice higher than the norm (Fig. 5). In the IIIrd group of animals normal bilirubin level in blood serum recovered more rapidly, than in rest of animals. The studied index to the 7th day statistically significantly differed from that in the rest groups towards a decrease in bilirubin concentration, however it was recovered to the norm by the 14th day. Bilirubin concentration in rat blood serum in all studied groups recovered spontaneously up to the norm by the 30th day.

Conclusions

Basing on the results obtained a combined usage of liver cryodestruction and xenoextract was demonstrated as more powerful stimulator of reparative processes in cirrhotically changed liver in comparison with the cryodestruction usage, that was manifested in a decrease in aminotransferase activity, bilirubin level, normalization of peroxidation processes and augmentation of albumin concentration in rat blood serum at the background of experimental liver cirrhosis.

Authors are thankful to Galchenko S.E., candidate of biological sciences and Sleta I.V., candidate of biological sciences for providing with xenoextract and assistance in experiment carrying-out.

References

1. Abragamovich O.O., Grabovska O.I., Terletska O.I. et al. Lipid peroxidation processes chronic liver damages // Med. khimiya.– 2000.– Vol. 2, N1.– P. 1-8.
2. Andreyeva L.N. Modification of method for lipid peroxidation determination in test with thiobarbituric acid // Lab. delo.– 1988.– N11.– P. 41-43.
3. Byzov V.V., Vysekantsev I.P., Galchenko S.E., Sandomirsky B.P. Application experience for endotracheal introduction of extract of xenospleen cryopreserved fragments in a complex treatment of patients with purulent processes in lungs // Problems of Cryobiology.– 2001.– N3.– P. 87-88.
4. Galchenko S.E., Belochkina I.V., Tynynyka L.M. Sandomirsky B.P. Effect of pancreas and liver extracts of pigs on rats with experimental pathologies of corresponding organs // Transplantologiya.– 2003.– Vol. 4, N1.– P. 68-70.
5. Petrenko A.Yu., Ochenashko O.V. Influence of human embryonic tissue preparations on lipids peroxidation intensity in rats acute toxic hepatitis // Problems of Cryobiology.– 2001.– N2.– P. 66-71.
6. Yakovenko E.P., Grigoriev P.Ya. Chronic liver diseases: diagnostics and treatment // Rus. med. zhurnal.– 2003.– Vol. 11, N5.– P. 291-296.
7. Shafranov V.V., Tsyganov D.I., Vissarionov V.A. et al. Cryosurgery theory and practice // Med. cryology: Proceeding of scientific works. Issue 1.- N. Novgorod, 2001.– P. 183-192.
8. Patent 64381 A Ukraine, IPC⁷ A61K35/12. Way for obtaining the extracts of xenogenous organs / S.E. Galchenko, N.Yu. Shkodovskaya, B.P. Sandomirsky, V.I. Grischenko (Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National

6. Яковенко Э.П., Григорьев П.Я. Хронические заболевания печени: диагностика и лечение // Рус. мед. журнал– 2003.– Т. 11.– № 5.– С. 291-296.
7. Шафранов В.В., Цыганов Д.И., Виссарионов В.А. и др. Крихирургия теория и практика // Мед. криология: Сб. науч. тр. Вып. 1.– Н. Новгород, 2001.– С. 183-192.
8. Пат. 64381 А Україна, МПК⁷ А61К35/12. Спосіб отримання екстрактів ксеногенних органів; С.Є. Гальченко, Н.Ю. Шкодовська, Б.П. Сандомирський, В.І. Грищенко (ІПКІК НАН України); № 2003054649; Заявлено 22.05.2003; Опубл. 16.02.2004; Бюл. № 2.– С. 4.41.
9. Ahmad T.A., Eguchi S., Yanaga K. et al. Role of intrasplenic hepatocyte transplantation in improving survival and liver regeneration after hepatic resection in cirrhotic rats // Cell Transplant.– 2002.– Vol. 11, N5.– P. 399-402.
10. Clavien P.A., Kang K.J., Selzner N. et al. Cryosurgery after chemoembolization for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis // J. Gastrointest. Surg.– 2002.– Vol. 6, N1.– P. 95-101.
11. Nagata H., Ito M., Cai J et al. Treatment of cirrhosis and liver failure in rat by hepatocyte xenotransplantation // Gastroenterology.– 2003.– Vol. 124, N2.– P. 442-431.

Accepted in 22.02.2005

Поступила 22.02.2005