

Acute liver ischemia : an experimental study in dogs with special emphasis on enzymatic and metabolic aspects

Citation for published version (APA):

Oostenbroek, R. J. (1986). Acute liver ischemia : an experimental study in dogs with special emphasis on enzymatic and metabolic aspects. Maastricht: Rijksuniversiteit Limburg.

Document status and date:

Published: 01/01/1986

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary and conclusions

In the introductory chapter of this thesis the rationale for performing the studies described in this thesis is given.

Acute hepatic ischemia has been the subject of many studies. Differences in study design and animal models have diminished the reproducibility of the results and have made interpretation of the data obtained difficult. Furthermore in most studies, no endeavour was made to quantitate liver injury.

Therefore the aim of this study was to establish a model of acute liver ischemia in the dog. To quantitate liver injury metabolic, enzymatic and morphologic sequelae of liver ischemia were studied. In addition metabolic and enzymatic parameters were studied with regard to their ability to distinguish at an early stage dogs that were going to die from acute liver ischemia from dogs that would survive.

In chapter 2 the literature is reviewed concerning the arterial blood supply to the liver. It is well documented that there is a great variability in the subhepatic arterial blood supply. It is less well known that suprahepatic arterial branches supply the liver, which are often forgotten in devascularization studies of the liver. Similarly it is not always appreciated that the proper hepatic arteries are no end arteries so that occlusion of the common hepatic artery or the celiac axis does not result in total interruption of the arterial bloodflow to the liver. Retrograde flow may occur from the gastroduodenal artery which is an arcadian artery receiving blood both from the celiac axis and from the superior mesenteric artery, and from the right gastric artery when it branches off from one of the proper hepatic arteries. This retrograde flow may promote survival after devascularization procedures of the liver. In chapter 4 retrograde flow is quantitated by means of injection of radioactive microspheres. It was demonstrated that if no great care was taken to interrupt the gastroduodenal artery and right gastric artery during the devascularization procedure, substantial residual arterial inflow to the liver remained. Similarly in surviving dogs the development of collateral flow after devascularization could be studied. The interval between performing the portacaval shunt / devascularization

and occlusion of the arterial inflow is crucial in this respect. An interval of not more than a week should be observed to prevent interferences because of the development of collateral circulation.

In chapter 3, the outline of the definitive protocol is described. The choice of anesthesia proved to be essential to ensure that anesthesia would not interfere with catecholamine-, insulin- and glucagon levels. A combination of fentanyl and oxygen was administered. Repeated intravenous dosages guaranteed reliable measurements of these hormones.

In chapter 5 the value was studied of sequential measurement of metabolic parameters before, during and after occlusion with regard to their ability to quantitate at an early stage the severity of ischemic injury and ultimately to indicate which dogs would die and which would survive.

For that purpose intermediates of glucose-, fat- and protein metabolism were measured in plasma, simultaneously with insulin, glucagon, epinephrine and norepinephrine. In a pilot study the hepatic artery was occluded for 60 minutes. Progressive increases in plasma glucagon, normal insulin levels but no hypoglycemia were found. In the definitive experiment an occlusion time of 120 minutes was employed. This resulted in moderate hypoglycemia coinciding with progressive increases in plasma glucagon and normal insulin levels.

After revascularization the liver appears to be able to maintain adequate glucose levels when high glucagon levels are present. This pattern was found both in surviving and in non-surviving dogs although in the non-survivors mean glucose levels were lower than in survivors albeit not significantly. In recent literature the clearance rate for amino acids is introduced ($A-fV/A$) and employed to estimate clearance of amino acids by the splanchnic tissue and specifically the liver. Especially the clearance rate of alanine was significantly higher in surviving dogs than in non-surviving dogs. Because alanine is quantitatively by far the most important nitrogen containing precursor for gluconeogenesis in the liver, this may indicate that the capacity of the liver to synthesize glucose is substantially diminished in non-surviving dogs. Clearance rates of other (groups of) amino acids (total AA, Gln, AAA, other AA) exhibited a similar trend as alanine but differences between survivors and non-survivors were not significant. Several other parameters were evaluated that have been propagated in the past as potential indicators of the degree of liver failure and/or encephalopathy. The BCAA/AAA ratio, the ketone body ratio, ammonia levels and the lactate/pyruvate ratio were evaluated. No significant differences between survivors and non-survivors were found.

There is still no clarity in the literature, as to whether liver injury can be detected histologically at an earlier stage than by means of measurement

of increased enzyme concentrations (chapter 6). To get an impression of the sequence of events occurring after occlusion of the hepatic artery liver biopsies were taken within 24 hr, and after 2, 4 and 6 weeks. The release of ALT and AST was followed with the use of enzymatic quantitation employing a two compartment model. Histological changes occurred uniformly within 24 hr after occlusion both in survivors and in non-survivors.

Massive necrosis occurred preferentially in zone 3 according to Rappaport. Recovery is characterized by some degree of fatty infiltration and relatively little regeneration. Within groups a considerable variability in the release of ALT and AST occurred. Notwithstanding this, within 12 hrs after occlusion, considerably more AST was released in non-survivors than in survivors. Apparently the release of enzymes is not an 'all or none' phenomenon. The hepatocyte is able to, at least temporarily, retain part of its contents and this process could preferentially influence the release of different enzymes. In this respect the permeability of the hepatocyte and of the mitochondrial membrane needs further study.

In chapter 7 the model developed is employed to study the elimination of CK during acute liver ischemia. The use of the cumulative release of CK in combination with CK-MB is an accepted method to estimate the size of a myocardial infarction. It is not completely elucidated, however, in how far the liver is responsible for the elimination of CK from plasma. It appeared from this study that elimination of CK continues during acute liver ischaemia. Because during complete occlusion we may assume that virtually no clearance can be effected by the liver, this implies that CK is cleared in other organs in the body. Measurements of the cumulative release of CK, HBD and ALT indicate that patients have, even after an uncomplicated myocardial infarction, on the third day still increased ALT activity. The quantity of ALT that can be released from cardiac muscle after an infarction, cannot explain this phenomenon, so that mild injury of the liver must be responsible for this.

Samenvatting en conclusies

Er is weinig bekend over de preventie of behandeling van schade aan de lever door ischemie of shock. Leverfunctiestoornissen, al of niet gepaard gaande met morfologische afwijkingen, zoals deze worden waargenomen in een scala van ziektebeelden, worden dikwijls geassocieerd met een bepaalde mate van ischemie van de lever. Als gevolg van de hoge metabole activiteit van de levercel wordt deze door anoxie snel beschadigd. In studies naar de pathogenese van leverinsufficiëntie als gevolg van ischemie wordt dierexperimenteel voornamelijk ófwel met technieken van geïsoleerde leverperfusie gewerkt, dan wel met devascularisatieprocedures van de lever met of zonder aanleg van een portaalsystemische shunt. Uit al deze experimenten zijn veel gegevens vrijgekomen over de meest gebruikte diersoorten, echter de grote variabiliteit per species blijkt de reproduceerbaarheid van de gebruikte technieken niet ten goede te komen. De gedetailleerde beschrijving van een reproduceerbaar model van acute leverischemie bij de hond is een belangrijk streven van onze studie geweest. Dit model werd getoetst op de metabole en enzymatische consequenties veroorzaakt door de aangebrachte ischemische schade. Het aanleggen van een portaalsystemische shunt is bij een dergelijk model voorwaarde, omdat occlusie van de vena portae langer dan een half uur tot de dood leidt. Additionele gevolgen van de shunt zelf dienen dan eveneens beschouwd te worden.

Bij literatuurstudie van de arteriële bloedvoorziening van de lever bij de hond blijkt er een grote variabiliteit in de subhepatische regio te bestaan (hoofdstuk 2). De invloed van de suprahepatische takken naar de lever, de arteriae phrenicae, werd in occlusie-studies van de afferente vasculaire inflow van de lever vaak vergeten, ondanks het reeds in 1954 door Popper aangegeven belang van genoemde takken tijdens subhepatische arteriële occlusie. In de beschrijving van vele devascularisatieprocedures wordt deze suprahepatische arteriële voorziening van de lever niet vermeld. Naast deze laatstgenoemde arteriële bloedvoorziening bestaat nog een ander belangrijk fysiologisch fenomeen tijdens arteriële occlusie van de lever. Na occlusie

van de arteria hepatica communis blijkt een aanzienlijke retrograde flow te bestaan vanuit de arteria gastroduodenalis en/of de arteria gastrica dextra. De grote variabiliteit van het verloop van de arteria gastrica dextra blijkt hierbij van essentieel belang. De retrograde flow bevordert de overleving van de hond na occlusie van de arteriële inflow gecombineerd met een portaalsystemische shunt. Deze retrograde flow kon met behulp van de microsfeertechniek bevestigd worden. Met behulp van deze techniek werd tevens gecontroleerd in welke mate de ischemie absoluut was en in welke mate er sprake moest zijn van een mogelijke ontstane collaterale flow (hoofdstuk 4). Van belang daarbij is de duur van het interval tussen het aanleggen van de portaalsystemische shunt en de werkelijke occlusie, aangezien bij een langer interval onvermijdelijk collateralen ontstaan. Een marge van één week tussen het aanleggen van een portacavale anastomose en de occlusie kon in dit verband worden aangehouden. Na diverse pilotstudies werd een protocol opgesteld voor de definitieve studie (hoofdstuk 3). De keuze van anesthesie bleek niet onbelangrijk met betrekking tot metingen van catecholaminen, insuline en glucagon. Een combinatie van fentanyl en zuurstof, intermitterend intraveneus toegediend, garandeerde betrouwbare metingen van deze hormonen.

Sequentieel gemeten metabole parameters tijdens en na occlusie zouden informatie kunnen verschaffen - separaat dan wel gecombineerd - welke metabole parameters reeds in een vroeg stadium de ernst van de ischemische schade kunnen weergeven, en welke parameters overleving of overlijden zouden kunnen aangeven. Daartoe werden intermediären uit de glucose-, vet- en aminozuurstofwisseling gemeten, simultaan met insuline, glucagon, epinephrine en norepinephrine (hoofdstuk 5). In een pilotstudie waarbij de arteria hepatica gedurende 60 minuten werd geoccludeerd, kon geen hypoglycemie worden geconstateerd. Wel werd een progressief stijgende hyperglycagonemie bij een vrijwel constante normoinsulinemie gemeten. Bij een occlusieduur van 120 minuten ontwikkelde zich echter een lichte hypoglycemie bij progressief stijgende plasmawaarden van glucagon en normale plasmawaarden van insuline. Na revascularisatie zijn lever en nier zichtbaar in staat in aanwezigheid van een persisterende hyperglucagonemie en normale insulinespiegels een adequaat glucosepeil te handhaven. Zowel in de groep van de overlevende als in de niet-overlevende groep honden werd dit patroon waargenomen, hoewel in de niet-overlevende groep gemiddeld lagere (niet significante) waarden werden gevonden.

In de recente literatuur is het begrip klaringsratio voor aminozuren geïntroduceerd. Hiermee kan, als flow naar de periferie bekend is en aannemende dat een steady state situatie bestaat, gemeten worden hoe groot de hoeveelheid aminozuren is die door het splanchnicus gebied wordt

opgenomen. Een dergelijke meting is gebruikt als leverfunctietest. In deze studie kon niet beschikt worden over flowmetingen, zodat alleen de klaringsratio ($A-fV/A$) voor alle aminozuren samen en voor (groepen) aminozuren afzonderlijk gebruikt is als indicator van het vermogen van de lever aminozuren af te breken of om te zetten in eiwit. Het meest duidelijke verschil tussen overlevers en niet-overlevers werd gevonden voor alanine. De alanine klaringsratio nam bij overlevers toe, terwijl deze bij niet-overlevers afnam. Daar alanine de belangrijkste stikstofbevattende precursor is voor gluconeogenese in de lever, wijst dit er op dat het vermogen van de lever glucose te vormen bij niet-overlevers belangrijk verminderd is. Het gebruik van de alanine klaringsratio verdient derhalve ook in de kliniek onderzocht te worden. De klaringsratio's van andere aminozuren (totaal AZ, Gln, AAZ, andere AZ) vertoonden eenzelfde beeld als alanine, maar de verschillen tussen overlevers en niet-overlevers waren niet significant.

Verschillende andere parameters zijn in het verleden gepropageerd om de mate van leverfalen of de graad van encephalopathie aan te geven.

- De plasmaratio tussen vertakte keten aminozuren en aromatische aminozuren was gemiddeld lager in de niet overlevende honden maar uitsluitend ten gevolge van toename van de spiegels van aromatische aminozuren. Door de hoge standaarddeviaties konden deze parameters niet gebruikt worden om onderscheid te maken tussen honden die stierven en honden die overleefden.
- De ketonlichaamratio verschilde niet significant tussen overlevers en niet-overlevers.
- De opname van ammoniak over de extremiteiten was al voor occlusie groter in de niet-overlevers. Dit verschil was niet significant. Na occlusie traden geen wezenlijke verschillen op in veneus en arterieel bloed tussen overlevers en niet-overlevers.
- De lactaat/pyruvaat ratio was evenmin significant verschillend tussen de groepen.

Het is in de literatuur nog steeds niet duidelijk of leverschade eerder histologisch kan worden vastgesteld dan wel door middel van het vaststellen van verhoogde enzymconcentraties in plasma. Om hier een indruk van te krijgen werden leverbiopsieën genomen binnen 24 uur en na 2, 4 en 6 weken. Met behulp van enzymquantitering volgens het twee-compartimenten model werd het vrijkomen van ALT en AST vervolgd (hoofdstuk 6). De histologische afwijkingen binnen 24 uur na occlusie waren in de groep van overlevenden en de groep van niet-overlevenden éénvoudig. Massale necrose trad op vooral in zone 3 volgens Rappaport. Herstel wordt gekarakteriseerd door vette infiltratie, waarbij relatief weinig regeneratie

werd gevonden. Binnen de groepen bestond een aanzienlijke variabiliteit in uitstorting van ALT en AST. Desalniettemin bleek in de twee groepen binnen de eerste twaalf uur na occlusie, een behoorlijke hoeveelheid AST meer te worden uitgestort in de niet-overlevenden dan in de overlevenden. De uitstorting van enzymen is blijkbaar niet een 'alles of niets' fenomeen. De levercel kan mogelijk, althans tijdelijk, een gedeelte van zijn inhoud vasthouden, waardoor het vrijkomen van enzymen wordt beïnvloed. De permeabiliteit van de hepatocyt en van de mitochondriale membraan verdient in dit kader verdere studie.

Het gebruik van de cumulatieve uitstorting van CK in combinatie met CK-MB voor het schatten van de uitgebreidheid van een hartinfarct is een geaccepteerde methode. De mogelijkheid, dat de lever medeverantwoordelijk is voor de eliminatie van CK uit plasma, werd getoetst in een gecombineerde studie bij infarctpatienten en honden volgens het beschreven model. De lever blijkt slechts marginaal betrokken bij de eliminatie van CK uit plasma. Bij metingen van cumulatieve uitstorting van CK, HBD en ALT blijkt dat patienten na een infarct, zelfs in ongecompliceerde gevallen, op de derde dag nog steeds verhoogde ALT-activiteit hebben. De hoeveelheid ALT die uit hartspierweefsel na een infarct vrij kan komen, kan dit niet verklaren, zodat milde leverschade hiervoor verantwoordelijk moet zijn.