

MARIA ROSNOWSKA, WOJCIECH ROWIŃSKI, JERZY FOLAŃSKI,  
HANNA ŁUKASIEWICZ, BOGDAN MICHAŁOWICZ, WALDEMAR OLSZEWSKI

## AKTYWNOŚĆ NIEKTÓRYCH ENZYMÓW PODCZAS PRZECHOWYWANIA I PERFUZJI IZOLOWANEJ HOMOGENNEJ WĄTROBY ŚWIŃSKIEJ

Z Zespołu Chirurgii Doświadczalnej i Transplantologii PAN  
Kierownik: prof. dr med. J. Nielubowicz  
i z Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej SDL w AM w Warszawie  
Kierownik: prof. dr med. J. Krawczyński

*Wykonano 5 perfuzji izolowanej homogennej wątroby świńskiej stosując opracowaną metodę przechowywania narządu. Badano aktywność aminotransferazy asparaginianowej i alaninowej, fosfatazy zasadowej, dehydrogenazy mleczanowej i glutaminianowej oraz poziom bilirubiny w płynie przerwaccyjnym i w krwi perfundującej świni-biorcy. Stwierdzono niewielki wzrost aktywności AspAT i LDH w płynie przerwaccyjnym. We krwi świni-biorcy zaobserwowano wzrost aktywności wszystkich badanych enzymów. Poziom bilirubiny utrzymywał się w granicach wartości prawidłowych. Badana we krwi świni-biorcy pod koniec perfuzji retencja bromsulftaleiny wynosiła po 45 minutach 27% wartości wyjściowych.*

Wątroba jest bardzo bogatym źródłem enzymów, katalizujących liczne reakcje przebiegające w tym narządzie. W przypadkach uszkodzenia tego narządu dochodzi najczęściej do wzrostu aktywności enzymatycznej w surowicy, co jest uwarunkowane charakterem zmian patologicznych zachodzących w komórkach wątroby. W stanach tych przedostają się do surowicy enzymy cytoplazmatyczne (przemawia to za zmianami przepuszczalności błony komórkowej), a przy uszkodzeniach poważniejszych także enzymy mitochondrialne (przemawia to za naruszeniem integralności hepatocytu i uszkodzeniem struktur komórkowych) (1, 2, 4).

Celem niniejszej pracy było zbadanie aktywności niektórych enzymów w surowicy podczas przechowywania homogennej wątroby świńskiej oraz ocena czynności tego narządu po podłączeniu go do świni-biorcy. Na tej zasadzie próbowano przekonać się, czy opracowana metoda przechowywania izolowanej wątroby dostatecznie zabezpiecza narząd przed uszkodzeniem i pozwala na wykorzystanie go do ewentualnego przeszczepu.

### MATERIAŁ I METODYKA

Jako zwierząt doświadczalnych użyto 15 świń rasy polskiej wagi 30—50 kg. W sumie przeprowadzono 5 doświadczeń. Do każdego doświadczenia użyto trzech świń. Jednej świni nazwanej w tej pracy biorcą, podłączono wątrobę drugiej świni nazwanej dawcą. Trzecią świnię skrawiano, a otrzymaną krew przetaczano świni-

-biorky. Wątrobę świni-dawcy przepłukiwano przez 3 godz. zimnym roztworem Ringera, podłączając ją dopiero potem do świni-biorky. Okres przepłukiwania wątroby przed podłączeniem do świni-biorky określa się jako okres przechowywania wątroby.

Kolejność postępowania była następująca: świnie-dawcę usypiano eunarconem i po zgonie natychmiast pobierano od niej wątrobę. W 5 minut po uspieniu zwierzęcia wątrobę *in situ* przepłukiwano około 10 litrami oziębionego do 4°C płynu Ringera z dodatkiem glukozy. Następnie narząd perfudowano przez okres 3 godz. w układzie zamkniętym, składającym się z pompy ISL-2, oksygenatora Polystan i wymiennika cieplnego. Podczas tego przepłukiwania temperatura płynu perfudującego wynosiła 10°C, a jego pH wahało się w granicach 7,5—7,6.

Gdy prezerwacja izolowanej wątroby zbliżała się ku końcowi, na stojącym obok stole operacyjnym usypiano świnie-biorec eunarconem i halanem z tlenem. Następnie wykonywano zespolenie żyły wrotnej z górną dolną bok do boku oraz zaciskano więzadło wątrobowo-dwunastnicze, zamykając tym samym cały dopływ krwi do wątroby biorky, po czym podłączano przepłukiwaną uprzednio przez 3 godz. izolowaną homogenną wątrobę do naczyń biodrowych biorky na czas 6 godz. Jednocześnie świni-biorky podłączano kroplówkę z glukozy, kontrolując co 60 min. poziom cukru we krwi. W obawie przed wystąpieniem hypoglikemii poziom cukru utrzymywano w granicach 200—400 mg/100 ml. W przypadku wstrzymania dopływu glukozy poziom cukru we krwi bardzo szybko obniżał się. Było to szczególnie wyraźne w późniejszych godzinach perfuzji.

Podczas zabiegu świnia-biorec otrzymywała dużą ilość heparyny, a w obawie przed fibrylizacją kwas epsilon-amino-kapronowy. Równowaga kwasowo-zasadowa krwi była kontrolowana co 60 min. przy użyciu aparatu Astrupa. Samo pH oznaczano co 10 min. W przypadku przesunięcia pH w kierunku kwaśnym oraz wzrostu ciśnienia parcjalnego CO<sub>2</sub> poprawiano odczyn krwi przy pomocy 5% węgla sodowego, podawanego w kroplówce dożylniej.

W płynie użytym do płukania i w krwi biorky oznaczano aktywność aminotransferaz: asparaginianowej (AspAT) i alaninowej (AlAT), fosfatazy zasadowej (AP), dehydrogenazy glutaminianowej (GLDH). Oznaczano też poziom bilirubiny, a w ostatniej godzinie perfuzji wykonywano próbę bromsulfaleinową. Przez cały czas perfuzji zbierano żółć wydzielaną przez perfudowaną wątrobę.

Aminotransferazę asparaginianową i alaninową oznaczano kolorymetrycznie metodą *Umbreita* (7). Jako górną granicę wartości prawidłowych przyjęto 50 j/ml dla AspAT i 30 j/ml dla AlAT.

Fosfatazę zasadową oznaczano metodą *Bessey* i wsp. podaną przez *Szczeklika* (6), używając jako substratu p-nitrofenylofosforanu sodu. Jako wartości prawidłowe przyjęto aktywność enzymu do 45 IU.

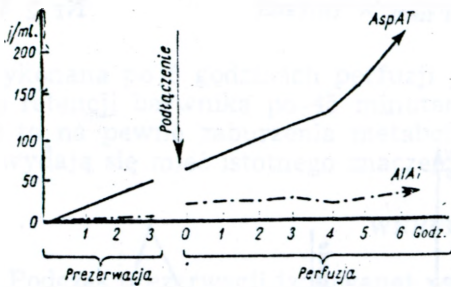
Dehydrogenazę mleczanową i glutaminianową oznaczano metodą spektrofotometryczną (1, 5). Odczytów ekstynkcji dokonywano na spektrofotometrze Unicam SP 600 przy długości fali 366 nm. Za górną granicę wartości prawidłowych przyjęto dla LDH 195 mIU, i dla GLDH 1,9 mIU.

Poziom bilirubiny oznaczano zmodyfikowaną metodą *Malloy* i *Evelyn* podaną przez *Krawczyńskiego* (3).

Próbę bromsulfaleinową (BSP) wykonywano w ostatniej godzinie perfuzji, podając świni 150 mg bromsulfaleiny dożylnie. Krew do badania pobierano w 5, 10, 15, 30 i 45 minut od wstrzyknięcia barwnika. Odczytu ekstynkcji dokonywano na spektrofotometrze *Coleman Junior*. Ekstynkcję po 5 minutach od chwili wstrzyknięcia barwnika przyjęto jako 100% retencji bromsulfaleiny. Jako wartości prawidłowe przyjęto retencję barwnika po 45 minutach, nie wyższą niż 5%.

## WYNIKI I OMÓWIENIE

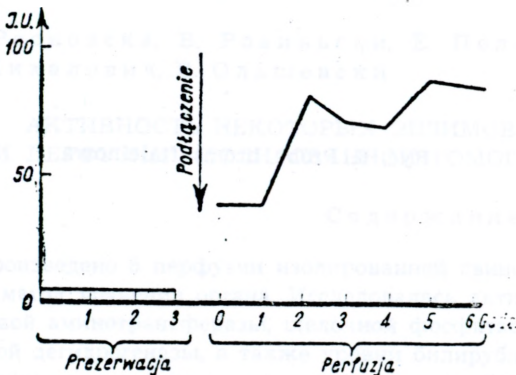
Uzyskane wyniki aktywności aminotransferaz w płynie użytym do płukania i w krwi podczas perfuzji przedstawiono na ryc. 1. Po 3 godz.



Ryc. 1. Aktywność aminotransferaz: asparaginianowej (AspAT) i alaninowej (AlAT).

prezerwacji w płynie Ringera aktywność AspAT wynosiła 47 j/ml, a aktywność AlAT 3 j/ml. W chwili podłączenia wątroby aktywność AspAT w krwi świni-biorcy wynosiła 58 j/ml, a aktywność AlAT 20 j/ml. Podczas perfuzji można było zaobserwować w krwi świni-biorcy stopniowe narastanie aktywności AspAT do wartości 220 j/ml. Aktywność AlAT była znacznie niższa i wynosiła w 6 godzinie perfuzji około 32 j/ml.

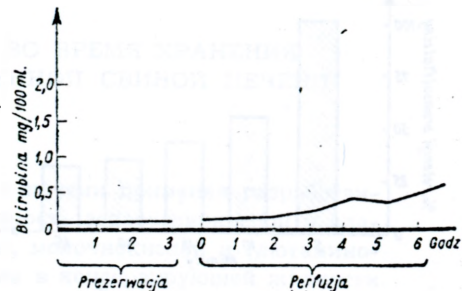
Aktywność fosfatazy zasadowej i poziom bilirubiny przedstawiają ryc. 2 a i 3 a.



Ryc. 2.

Ryc. 2. Aktywność fosfatazy zasadowej (AP).

Ryc. 3. Poziom bilirubiny.



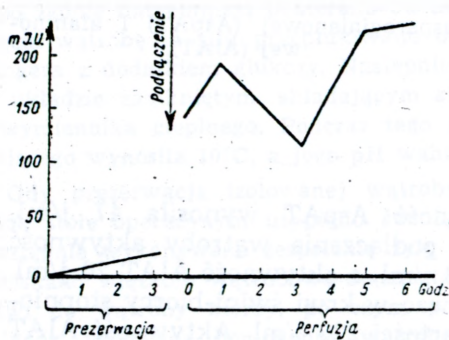
Ryc. 3.

W płynie prezerwacyjnym przepłukującym wątrobę po 3 godzinach prezerwacji nie stwierdzono aktywności fosfatazy zasadowej. Podczas samej perfuzji aktywność fosfatazy zasadowej uległa już w drugiej godzinie podwyższeniu do 70 IU i na tym poziomie utrzymywała się do końca zabiegu.

Poziom bilirubiny przez cały czas perfuzji utrzymywał się w granicach prawidłowych i nigdy nie przekroczył 1,0 mg/100ml.

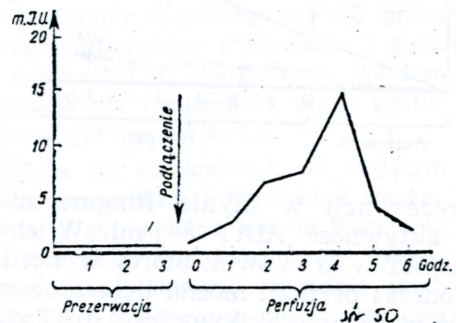
Zachowanie się aktywności dehydrogenazy mleczanowej i glutaminianowej przedstawia ryc. 4 a i 5 a.

Aktywność LDH w płynie perfudującym po 3 godzinach prezerwacji wątroby nie przekraczała 25 mIU. We krwi aktywność enzymu po 6 go-



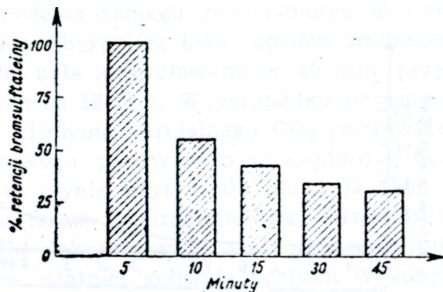
Ryc. 4.

Ryc. 4. Aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH).



Ryc. 5.

Ryc. 5. Aktywność dehydrogenazy glutaminowej (GLDH).



Ryc. 6. Próba bromsulfaleinowa.

dzinach perfuzji wynosiła około 270 mIU, co wynosi niewiele ponad górną granicę wartości prawidłowych.

Aktywność GLDH w płynie perfudującym po 3 godzinach perfuzji była bliska zeru. Natomiast we krwi świni-biorcy zaznaczał się stały i wyraźny wzrost aktywności tego enzymu, osiągający swój szczyt (14 mIU) w 4 godzinie perfuzji, a następnie spadek do wartości niższych (4 mIU) pod koniec zabiegu.

#### OMÓWIENIE

Oceniając powyższe obserwacje można powiedzieć, że aktywność enzymatyczna płynu prezerwacyjnego przepływającego przez wątrobę, po 3 godzinach jest bardzo niewielka i w zasadzie dotyczy tylko AspAT i LDH, a więc raczej enzymów cytoplazmatycznych. Aktywność pozostałych enzymów nie daje się w płynie prezerwacyjnym uchwycić. Po podłączeniu prezerwowanej wątroby do świni-biorcy dochodzi w jej krwi do zwyczajki aktywności, głównie aminotransferazy asparaginianowej i dehydrogenazy glutaminianowej, oraz w mniejszym stopniu fosfatazy zasadowej. Wyniki te mogą pośrednio wskazywać na zwiększenie przepuszczalności błony komórkowej oraz na niewielkie zmiany destrukcyjne w mitochondriach tych komórek.

Wykonana po 6 godzinach perfuzji próba bromsulftaleinowa wykazała 27% retencji barwnika po 45 minutach od chwili wstrzyknięcia. Wskazuje to na pewne zaburzenia metaboliczne perfudowanej wątroby, które nie wydają się mieć istotnego znaczenia.

#### WNIOSKI

1. Podczas przerwacji izolowanej wątroby świńskiej zauważono wzrost aktywności niektórych enzymów cytoplazmatycznych w perfudującym płynie Ringera.

2. W okresie perfuzji izolowanej homogennej wątroby świńskiej zaobserwowano we krwi świni-biorcy stopniowe niewielkie narastanie aktywności aminotransferaz, fosfatazy zasadowej, dehydrogenazy mleczanowej i glutaminianowej.

3. Wykonana pod koniec perfuzji próba bromsulftaleinowa wykazała uszkodzenie wątroby miernego stopnia. Retencja barwnika po 45 minutach wynosiła 27%.

M. Росновска, В. Ровиньски, Е. Полянски, Г. Лукасевич,  
Б. Михалович, В. Ольшевски

#### АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ЭНЗИМОВ ВО ВРЕМЯ ХРАНЕНИЯ И ПЕРФУЗИИ ИЗОЛИРОВАННОЙ ГОМОГЕННОЙ СВИНОЙ ПЕЧЕНИ

##### Содержание

Произведено 5 перфузии изолированной свиной печени применяя разработанный метод хранения органа. Исследовалась активность аспарагинокислой и аланиновой аминотрансферазы, щелочной фосфатазы, молочнокислой и глютаминокислой дегидрогеназы, а также уровни билирубина в консервирующей жидкости и перфудирующей крови свиный-реципиента. Обнаружено незначительное увеличение активности AspAT и LDH в консервирующей жидкости. В крови свиный-реципиента обнаружено увеличение активности всех исследуемых энзимов. Уровень билирубина удерживался в пределах нормальных величин. Исследована в крови свиный реципиента к концу перфузии ретенция бромсульфталена составляла по истечении 45 минут 27% исходных величин.

M. Rosnowska, W. Rowiński, J. Polański, H. Łukasiewicz,  
B. Michałowicz, W. Olszewski

#### THE ACTIVITY OF SOME ENZYMES DURING STORAGE AND PERFUSION OF ISOLATED HOMOGENIC PIG LIVER

##### Summary

The 5 perfusions of isolated homogenic pig liver were carried out using elaborated method of its storage. The activity of asparagine and alanine aminotransferases, alkaline phosphatase, lactate and glutamate dehydrogenases and bilirubin concentration in preservative fluid and in the blood of acceptor pig were determined.

The sow increase of GOT and LDH activities in preservative fluid were demonstrated. In the blood of acceptor-pig the activities of all of the enzymes tested were elevated.

The bilirubin concentration was normal. At the end of perfusion the bromsulphalein retention in acceptor-pig blood amounts after 45 minutes 27% of initial value.

#### PIŚMIENNICTWO

1. *Bergmeyer H.*: Methods of enzymatic analysis, Verlag Chemie, GMBH, 1963, Vanheim/Bergsts. — 2. *Boyd J.*: Biochem. J., 1961, 81, 434. — 3. *Krawczyński J., Osiński T.*: Laboratoryjne metody diagnostyczne, PZWL, Warszawa, 1967. — 4. *Rosnowska M., Sawicki Z., Krawczyński J.*: Clin. Chim. Acta, 1968, 20, 7. — 5. *Schmidt E.*: Klin. Wschr., 1962, 40, 962. — 6. *Szczeklik E.*: Enzymologia kliniczna, PZWL, Warszawa, 1967. — 7. *Umbreit W., Kingsley G., Schaffert R.*: J. Lab. Clin. Med. 1957, 49, 454.

Wpłynęło dnia 18.10.1969

Adres autorów: Dr Maria Rosnowska, Warszawa, Cegiłowska 80, Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej SDL.