

WALDEMAR OLSZEWSKI, JERZY POLAŃSKI, HANNA LUKASIEWICZ, MARIA ROSNOWSKA, BOGDAN MICHAŁOWICZ, WOJCIECH ROWIŃSKI, ANDRZEJ ZAWADZKI, ANDRZEJ ROSNOWSKI, IRMINA DURA-KUBAS, JAN NIELUBOWICZ

## PRZECHOWYWANIE WĄTROBY ŚWINI ZA POMOCĄ PERFUZJI W HIPOTERMII

### II. OCENA CZYNNOSCI PRZECHOWYWANEJ WĄTROBY PO PODŁĄCZENIU DO KRĄŻENIA ZWIERZĘCIA

Z Zespołu Chirurgii Doświadczalnej i Transplantologii CMDiK PAN

Kierownik: prof. dr J. Nielubowicz

i z Zakładu Izotopów Zakładu Radiologii AM

Kierownik: prof. dr L. Zgliczyński

i z Zakładu Anatomii Patologicznej AM w Warszawie

Kierownik: prof. dr J. Groniowski

W poprzedniej pracy omówiono zmiany biochemiczne i przepływu w wątrobie przechowywanej przez okres 3 godzin w hipotermii w warunkach stałego przepływu. Praca niniejsza miała na celu próbę oceny czynności przechowywanej w taki sam sposób wątroby po podłączeniu jej do krążenia świni, u której niewydolność wątroby wywołano zaciskając więzadło wątrobowo-dwunastnicze.

### POSTĘPOWANIE

Badania przeprowadzono na 18 świnich rasy polskiej wagi od 17 do 50 kg. Każde doświadczenie dzielono na dwa etapy. W I etapie wątrobę pobraną ze zwłok zwierzęcia przechowywano przez okres 3 godzin w sztucznym układzie perfuzyjnym w hipotermii. Warunki przechowywania wątroby oraz dokładny opis układu perfuzyjnego podano w poprzedniej pracy (5, 6). W II etapie doświadczenia przechowywaną wątrobę podłączono do krążenia zwierzęcia.

W uśpieniu ogólnym mieszaniną halotanu z tlenem (stężenie halotanu od 3,5 do 1 vol%) otwierano jamę brzuszną dbając o bardzo dokładne zatrzymanie krwawienia. Po wykonaniu zespolenia żyły wrotnej z żyłą główną dolną (bok do boku) zaciskano więzadło wątrobowo-dwunastnicze starając się zamknąć żyłę wrotną (powyżej zespolenia) i tętnicę wątrobową w celu wyłączenia czynności własnej wątroby świni. Przechowywaną uprzednio wątrobę umieszczoną w specjalnym pojemniku podłączano do naczyń biodrowych świni.

Krew tętnicza wypływająca z tętnicy biodrowej świni przepływała przez tętnicę wątrobową oraz przez żyłę wrotną świni pod ciśnieniem 70—90 mm Hg oraz 15 mm Hg. Wypływająca z izolowanej wątroby przez żyłę główną dolną krew odprowadzano do żyły biodrowej świni. W chwili rozpoczęcia przepływu krwi przez wątrobę,

świni podawano heparynę w dawce 4 mg/kg wagi. Dalsze podawanie heparyny uzależnione było od badania czasu krzepnięcia z mocną trombiną. Przez cały czas doświadczenia w sposób stały mierzono i zapisywano ciśnienie tętnicze i ośrodkowe ciśnienie żyłne u świni oraz ciśnienie w żyłce wrotnej za pomocą Mingografu — Elema.

Czas perfuzji wynosił od 3 do 5 godzin. W czasie perfuzji wykonywano okresowo badania przepływu krwi przez wątrobę, oznaczano ciśnienie parcjalne tlenu we krwi dopływającej i wypływającej z wątroby oraz mierzono objętość wydzielonej żółci. Zużycie tlenu przez wątrobę obliczano ze wzoru:

$$\text{Zużycie tlenu (ml/g/min)} = \frac{\text{różnica t-z w wysyceniu tlenem (w vol\%)} \times \text{przepływ krwi przez wątrobę (w ml)}}{100 \times \text{waga wątroby (w gramach)}}$$

Badano ponadto układ krzepnięcia i fibrylizy, stan równowagi kwasowo-zasadowej krwi świni, aktywność aminotransferaz w surowicy krwi, frakcje białek i poziomu cukru we krwi. Wykonywano ponadto badania izotopowe przepływu miejscowego krwi z użyciem Xe 133 i czynności wątroby z użyciem czerwieni bengalskiej znakowanej J 131. Równowagę kwasowo-zasadową oznaczano wg metody Astrupa na aparacie Astrupa.

W niniejszej pracy podajemy wyniki dotyczące wyglądu makroskopowego wątroby, przepływu krwi oraz zużycia tlenu przez wątrobę, wydalanie żółci, równowagę kwasowo-zasadową, jak również badania izotopowe i histologiczne oraz wyniki ważniejszych badań biochemicznych.

## WYNIKI

Po rozpoczęciu perfuzji wątroba wypełniała się krwią najszybciej w częściach przywnękowych, podczas gdy jej części obwodowe gorzej były ukrwione. W ciągu 30 minut od początku przepływu cała wątroba wypełniona była krwią. W ciągu 30 minut temperatura wątroby świni wzrosła od 10° do 37°C, przy czym początkowo spadała temperatura świni — biorcy do 35°C. Aby utrzymać temperaturę zwierzęcia ogrzewano je promieniami podczerwonymi. Ciśnienie tętnicze świni po rozpoczęciu perfuzji spadało średnio o 20 mm Hg i wynosiło 80—90 mm Hg. W czasie perfuzji ciśnienie obniżało się i pod koniec było zazwyczaj niższe od wyjściowego o 20 do 30 mmHg.

Zmiany równowagi kwasowo-zasadowej podczas 3 godzinnej perfuzji wskazują na odchylenia w kierunku kwasicy oddechowej. Obserwujemy nieznaczne podwyższenie ciśnienia parcjalnego dwutlenku węgla w krwi tętniczej, spowodowane zarówno wzrostem zawartości dwuwęglanów jak i niewielkim spadkiem pH. Zmiany te są regulowane przez układy buforujące krwi. W jednym tylko przypadku obserwowaliśmy alkalozę metaboliczną.

W miarę trwania perfuzji obserwujemy dalsze przesuwanie się pH w stronę kwaśną. Zaznacza się to bardzo wyraźnie spadkiem stężenia dwuwęglanów we krwi ze średnim obniżeniem stężenia kwasu węglowego (niewielki spadek pCO<sub>2</sub>). Zmiany te prowadzą do kwasicy metabolicznej wyrównywanej podczas trwania perfuzji dodawaniem 5% NaHCO<sub>3</sub>. W jednym przypadku podczas całej 5 godzinnej perfuzji istniała alkalozę oddechowa (ryc. 3).

W czasie perfuzji obserwowaliśmy wysoką czynność antyheparynową osocza (sprawdzaną czasem krzepnięcia z mocną trombiną). W przypadku skracania się czasu krzepnięcia podawaliśmy dodatkowe ilości heparyny. Już po 1 godzinie perfuzji spostrzegano spadek poziomu fibrynogenu, płytek i aktywację fibrynolizy. Fibrynolizę hamowano dożylnym podawaniem EACA i AMCHA. Szczegółowe omówienie charakteru zaburzeń układu krzepnięcia i fibrynolizy zostało opublikowane oddzielnie (4).

Zauważono ponadto stopniowe narastanie aktywności aminotransferaz (tab. 1), fosfatazy alkalicznej, dehydrogenazy mleczanowej i glutaminowej w surowicy krwi (8, 9). Próba bromosulfaleinowa wykazała, że retencja barwnika po 45 minutach wynosiła średnio 27%.

Tabela 1  
Narastanie aktywności aminotransferaz w ciągu perfuzji

Badany enzym	A k t y w n o ś ć	
	wyjściowa	końcowa
AspAT	58 j/ml	220 j/ml
ALAT	20 j/ml	32 j/ml

Tabela 2

Przepływ krwi, zużycie tlenu przez wątrobę i wydzielanie żółci przez przechowywaną wątrobę podłączoną do świni

Lp.	Przepływ cc/g.wątroby/min.						Zużycie tlenu cc/g/min.			Żółć cc/100 g/min.
	0	1	2	3	4	5	1	3	5	
1	0,96	1,00	0,96	0,96			—	—	—	0,45
2	0,61	0,69	0,92	0,92			0,006	0,013		0,45
3	0,45	0,61	0,61	0,61			0,014	0,018		0,82
4	1,10	0,63	0,63	0,63			0,008	0,008		0,26
5	0,63	0,70	0,74	0,49			0,006	0,028		0,78
6	0,60	0,60	0,60	0,72	0,48	0,48	0,025	0,012		1,20
7	0,36	0,66	0,96	1,09	0,60	0,96	0,029	0,087	0,073	3,54
8	1,30	0,57	0,66	0,64	0,86	0,60		0,018	0,029	0,29

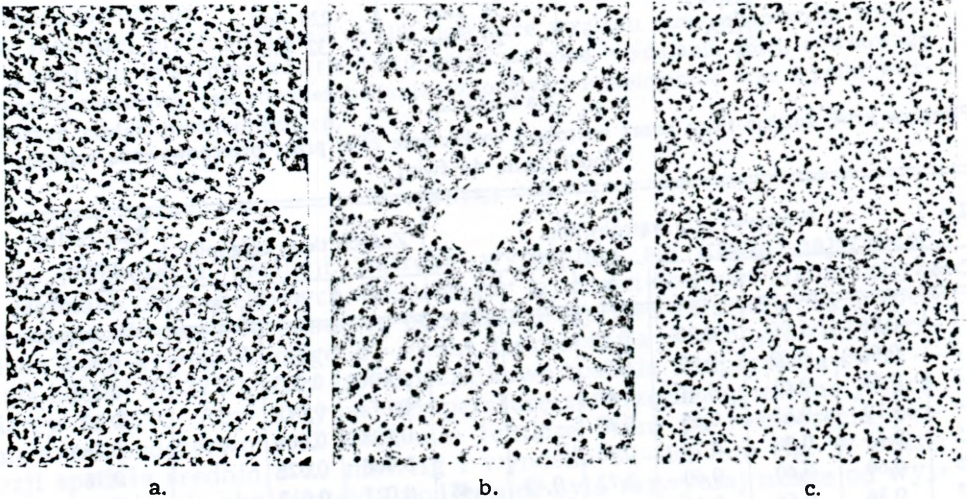
Badania przepływu krwi przez wątrobę w czasie perfuzji (tab. 2). W ciągu 30 minut od początku przepływu cała wątroba wypełniona była krwią, stwierdzono jednak wyraźną różnicę w ukrwieniu poszczególnych jej części. Części płatów centralne i przywnękowe wątroby były różowoczerwone, natomiast części obwodowe były czerwono-sine. W miarę trwania perfuzji liczba czerwono-sinych miejsc malała, a wzrastała ilość dobrze ukrwionego mięszu. Przepływ krwi przez wątrobę w czasie perfuzji wahał się od 0,36 do 1,3 ml/g/min. zależnie od ciśnienia tętniczego świni i od oporu obwodowego wątroby. Bezpośrednio po podłączeniu wątroby do krążenia przepływ wahał się od 0,45 do 1,3 ml/g/min., średnio 0,75 ml/g/min., przy ciśnieniu tętniczym świni 90 mm Hg oraz ciśnieniu

w zyle wrotnej równym 15 mm Hg. W ciągu następnych godzin doświadczenia przepływ w zasadzie utrzymywał się na niezmiennym poziomie jeśli ciśnienie tętnicze świni nie obniżało się. W trzech doświadczeniach, w których perfuzja trwała przez 6 godzin, w końcowym okresie perfuzji stwierdzono spadek przepływu krwi, który wynosił od 0,48 do 0,6 ml/g/min.

Tabela 3

Przepływ krwi, zużycie tlenu i wydalanie żółci przez przechowywaną wątrobę uzyskane po podłączeniu do sztucznego układu perfuzyjnego i po podłączeniu do zwierzęcia

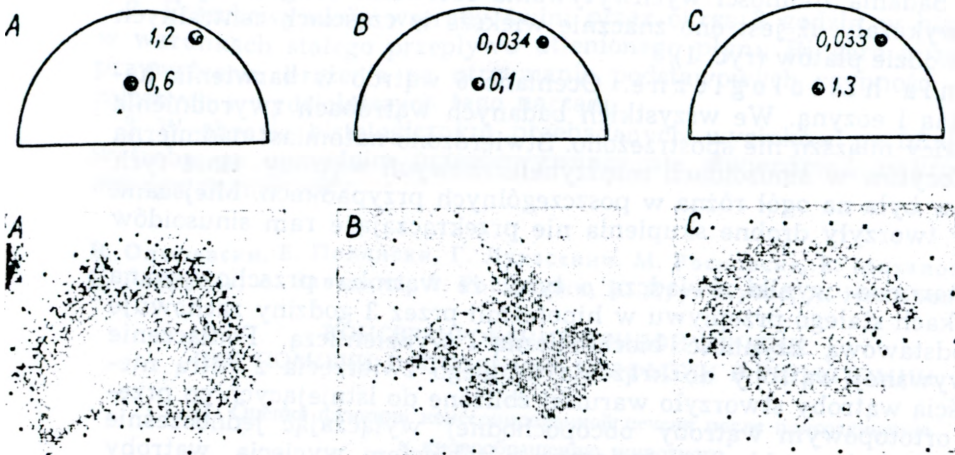
	Czas trwania w godz.	Przepływ cc/g/min.	Zużycie tlenu ml/g/min.	Wydalenie żółci ml/100g na godz.
Sztuczny układ perfuzyjny	3	0,88	0,020	0,46
Podłączenie do zwierzęcia	3	0,74	0,013	0,61
	6	0,70	0,041	1,895



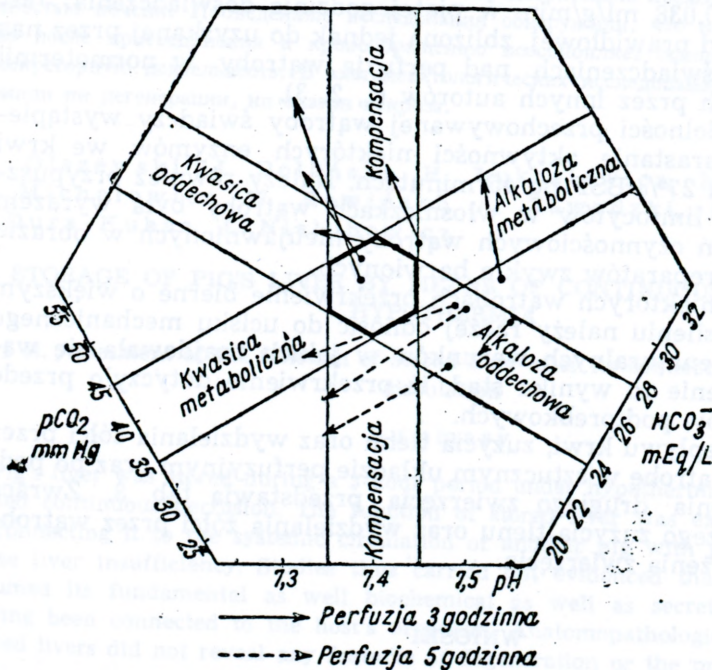
Ryc. 1. Badanie histologiczne. a — Wątroba porównawcza H. E.  $\times 150$ . b — Wątroba po przechowaniu H. E.  $\times 150$ . c — Wątroba po przechowaniu i perfuzji. W sinusoidach międzybeleczkowych wątroby widoczne liczne limfocyty. H. E.  $\times 150$ .

Zużycie tlenu przez wątrobę w czasie perfuzji wahało się od 0,006 do 0,087 ml/g/min., wzrastając wyraźnie w miarę trwania perfuzji. W pierwszej godzinie perfuzji zużycie tlenu wynosiło średnio 0,015 ml/g/min., w trzeciej godzinie 0,029 ml/g/min., a w piątej godzinie (w trzech przypadkach) 0,038 ml/g/min.

Wydzielanie żółci przez wątrobę rozpoczynało się wkrótce po ukrwieniu wątroby i było wyraźnie zależne od przepływu i zużycia tlenu. Wątroba wydzielała od 0,26 do 3,54 ml żółci/100 g/godz., średnio 1,06 ml/100 g wątroby/godz. Stężenie bilirubiny w żółci wynosiło od 7 do 42 mg<sup>o</sup>/c. Wyniki przepływu krwi, zużycia tlenu i wydzielania żółci podane w tab. 2.



Ryc. 2. Badania izotopowe wątroby. W górnej części ryciny przedstawiono przepływy przez wątrobę świnią badaną przy użyciu Xe 133. Przepływ w obwodowych i środkowych częściach wątroby w ml/g/min. W dolnej części ryciny skautygramy uzyskane przy użyciu czerwieni bengalskiej J 131. A — wątrobą prawidłową, B — wątrobą po 3 godz. przechowywaniu, C — wątrobą po przechowywaniu i 3 godz. perfuzji po podłączeniu do świni.



Ryc. 3. Równowaga kwasowo-zasadowa w poszczególnych perfuzjach. Wyjaśnienie wyników za pomocą rysunku przedstawia się zgodnie z umieszczonymi napisami. Sześciobok zajmujący środek tabeli oznacza normę. Pola położone w okolicy godz. 9.00 i 3.00 oznaczają zmiany mieszane, będące wynikiem zmian oddechowych jak i metabolicznych. Pola po obydwóch stronach kolumny pionowej oznaczających kompensację są przeznaczane dla odnotowania zmian wykazujących tendencję do wyrównania.

Wykonane przez nas badania izotopowe wykazały, że przepływ krwi przez części centralne pętli był kilkakrotnie wyższy niż na obwodzie wątroby. Badania zdolności wychwytywania czerwieni bengalskiej przez wątrobę wykazały, iż jest ono znacznie większe w częściach centralnych niż na obwodzie pętli (ryc. 1).

Badania histologiczne. Oceniano 6 wątrób w barwieniu hematoksyliną i eozyną. We wszystkich badanych wątróbach zwyrodnienia ani martwicy mięszu nie spostrzeżono. Stwierdzono natomiast nadmierną ilość limfocytów w sinusoidach międzybeleczkowych wątroby. Ilość tych limfocytów była na ogół różna w poszczególnych przypadkach. Miejscami limfocyty tworzyły drobne skupienia nie przekraczające ram sinusoidów (ryc. 2).

Przedstawione wyniki świadczą o tym, że wątroba przechowywana w warunkach stałego przepływu w hipotermii przez 3 godziny zachowuje swoją podstawową czynność biochemiczną i wydzielniczą. Podłączenie przechowywanej wątroby do krążenia drugiego zwierzęcia z ostrą niewydolnością wątroby stworzyło warunki zbliżone do istniejących po przeszczepie ortotopowym wątroby obc pochodnej wyłączając jednocześnie wszystkie techniczne kłopoty związane z zabiegiem wycięcia wątroby i przeszczepienia.

Przepływ krwi przez wątrobę wynosił średnio 0,75 ml/g/min., co stanowi wartość nieco niższą od prawidłowej. Zależało to zapewne od nieco obniżonego ciśnienia tętniczego świni oraz od oporu obwodowego wątroby. Zużycie tlenu przez perfundowaną wątrobę wynosiło średnio w pierwszej godzinie 0,015 do 0,038 ml/g/min. w piątej godzinie doświadczenia. Jest to wartość niższa od prawidłowej, zbliżona jednak do uzyskanej przez nas w poprzednich doświadczeniach nad perfuzją wątroby w normotermii oraz do uzyskanych przez innych autorów (1, 2, 3).

O niepełnej wydolności przechowywanej wątroby świadczy wystąpienie fibrynolizy, narastanie aktywności niektórych enzymów we krwi świni oraz retencja 27% BSF po 45 minutach. Należy również przypuszczać, że obecność limfocytów w włóscinkach wątroby była wyrazem zmian lub zaburzeń czynnościowych wątroby nieujawnionych w obrazie mikroskopowym preparatów zwykle barwionych.

Występujące w niektórych wątróbach przekrwienie bierne o większym czy mniejszym nasileniu należy raczej odnosić do ucisku mechanicznego wynikającego z nienaturalnych warunków w jakich znajdowała się wątroba. Przypuszczenie to wynika stąd, iż przekrwienie dotyczyło przede wszystkim odcinków podtorebkowych.

Porównanie przepływu krwi, zużycia tlenu oraz wydzielania żółci przez przechowywaną wątrobę w sztucznym układzie perfuzyjnym oraz po podłączeniu do krążenia drugiego zwierzęcia przedstawia tab. 3. Zwraca uwagę fakt większego zużycia tlenu oraz wydzielania żółci przez wątrobę podłączoną do krążenia zwierzęcia.

#### WNIOSKI

1. Podłączenie przechowywanej wątroby do krążenia drugiego zwierzęcia z ostrą niewydolnością wątroby pozwala na badanie jej czynności metabolicznej i wydzielniczej w warunkach zbliżonych do istniejących po przeszczepieniu wątroby.

2. Przechowywanie wątroby świni przez okres 3 godzin w hipotermii w warunkach stałego przepływu utlenionego płynu Ringera pozwala po przywróceniu krążenia na utrzymanie podstawowych czynności biochemicznych i wydzielniczych tego narządu.

3. W obrazie histologicznym przebadanych wycinków perfundowanej wątroby po uprzednim przechowywaniu nie stwierdzono zwyrodnienia ani ognisk martwicy.

В. Ольшевски, Е. Полянски, Г. Лукасевич, М. Росновска, Б. Михалович,  
В. Ровински, А. Завадзки, А. Росновски, И. Дура-Кубас, Я. Нелюбович

#### КОНСЕРВИРОВАНИЕ СВИНОЙ ПЕЧЕНИ ПРИ ПОМОЩИ ПОСТОЯННОЙ ПЕРФУЗИИ В ГИПОТЕРМИИ

##### II. Оценка функции консервированной печени после присоединения к кровообращению животного

##### Содержание

Свиную печень консервировали в течение 3 часов в условиях постоянного протока жидкости в гипотермии (+4°C). Функцию печени после её консервирования исследовали присоединяя её к организму другой свиньи с предварительно вызванной острой недостаточностью печени. Проведенные исследования обнаружили, что консервированная печень после присоединения к кровообращению возобновляет основную биохимическую и секреторную деятельность. В анатомопатологических исследованиях печеней не обнаружили ни дегенерации, ни очагов некроза.

W. Olszewski, J. Polański, H. Łukasiewicz, M. Rosnowska,  
B. Michałowicz, W. Rowiński, A. Zawadzki, A. Rosnowski,  
I. Dura-Kubas, J. Nielubowicz

#### STORAGE OF PIG'S LIVER BY MEANS OF CONTINUOUS PERFUSION HYPOTHERMIA

##### Part II. Assessment of the function of stored liver after its connection to the animal's circulation

##### Summary

Pig's liver was stored during a 3-hour period under hypothermia (+4°C) at maintained continuous perfusion. The function of stored liver was examined by means of connecting it to the systemic circulation of another pig with previously induced acute liver insufficiency. Studies thus carried out evidenced that the stored liver resumed its fundamental as well biochemical as well as secretory activity after having been connected to the host's organism. Anatomopathologic examinations of stored livers did not reveal any features of degeneration or the presence of necrotic foci.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Abouna G. M., Ashcroft T., Hull C., Hodson A., Kirkly J., Walder D. N.: The assessment of function of the isolated perfused porcine liver. *Brit. J. Surg.*, 1969, 4, 289. — 2. Drapanas T., Zemel R., Vang J. O.: Hemodynamics of the isolated per-

fused pig liver. *Ann. Surg.*, 1966, 164, 522. — 3. *Ham J. M., Pirola R. C., Davidson G. M., Yarrow S., Elmslie R. G.*: Pig liver perfusion for the treatment of acute hepatic coma. *Sur. Gin. Obst.*, 1968, 127, 543. — 4. *Lukasiewicz H., Rosnowska M., Polański J., Rowiński W., Olszewski W.*: Układ krzepnięcia i fibrynolizy u świń podczas pozaustrojowego podłączenia wątroby. *Pol. Przeg. Chir.*, w druku. 5. *Nielubowicz J., Olszewski W., Rowiński W., Bulien D.* i inni: Badania doświadczalne pozaustrojowej perfuzji wątroby. *Pol. Przeg. Chir.*, 1969, 41, 1. — 6. *Olszewski W., Polański J., Bulien D., Graben W., Nielubowicz J.*: Zaburzenia metaboliczne i hemodynamiczne w perfundowanej pozaustrojowo wątrobie. *Pol. Przeg. Chir.*, 1969, 41, 760. — 7. *Olszewski W., Polański J., Lukasiewicz H., Michalowicz B., Rosnowska M., Dura-Kubas I.*: Przechowywanie wątroby świni za pomocą stałej perfuzji w hipotermii. I. Zmiany biochemiczne i przepływu w przechowywanej przez 3 godziny wątrobie. *Pol. Przeg. Chir.*, w druku. 8. *Rosnowska M., Rowiński W., Polański J., Lukasiewicz H., Michalowicz B., Olszewski W.*: Aktywność niektórych enzymów podczas prezerwacji i perfuzji izolowanej wątroby świńskiej. *Diagnostyka Laboratoryjna* — w druku. — 9. *Rosnowska M., Olszewski W., Rowiński W., Polański J., Lukasiewicz H., Zawadzki A.*: Próba oceny przemiany węglowodanowej w perfundowanej wątrobie świńskiej. *Diagnostyka Laboratoryjna* — w druku.

Pracę nadesłano: 28. XII. 1969.

Adres autora: Warszawa, ul. Dworkowa 3.