

71

MARIA ROSNOWSKA, WALDEMAR OLSZEWSKI, WOJCIECH ROWIŃSKI  
JERZY POLAŃSKI, HANNA ŁUKASIEWICZ, ANDRZEJ ZAWADZKI

## PRÓBA OCENY PRZEMIANY WĘGLOWODANOWEJ W PERFUDOWANEJ WĄTROBIE ŚWIŃSKIEJ

Z Zespołu Chirurgii Doświadczalnej i Transplantologii  
Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN  
Kierownik: prof. dr med. J. Nielubowicz

Autorzy badali metabolizm glukozy i glikogenu podczas perfuzji homogennej wątroby świńskiej przerwowanej opracowaną przez siebie metodą. Podczas 3-godzinnej przerwy z wątroby wypłukuje się niewielka część glikogenu uprzednio rozłożonego do glukozy, w wyniku czego dochodzi do wzrostu glikemii płynu Ringera perfudującego wątrobę. Po podłączeniu wątroby do świni-biorcy podczas pierwszych 2 godzin dochodzi do uwolnienia prawie całego zmagazynowanego w wątrobie glikogenu, co potwierdza badanie histochemiczne punktów wątroby, barwionych met. PAS. W krwi żyłnej świni-biorcy dochodzi w tym czasie do wzrostu poziom glukozy i glikogenu. W wątrobie własnej świni-biorcy, w której podwiązano naczynia następuje spadek glikogenu do 4% wartości wyjściowych, przyjętych jako 100%. Poziom glikogenu w mięśniach prądkowanych utrzymuje się przez cały czas trwania perfuzji na stałym poziomie. Wykonana w ostatniej godzinie perfuzji próba bromsulftaleinowa wykazała 28% retencji barwnika. Jeżeli do podawanej dożylnie glukozy dodano chlorek potasowy i insulinę, wówczas zaobserwowano jedynie niewielki ubytek glikogenu w perfudowanej wątrobie, co zostało potwierdzone badaniem histochemicznym. Wykonana u świni-biorcy próba bromsulftaleinowa wykazała tylko 19% retencji bromsulftaleiny po 45 minutach.

Wykonując doświadczalną perfuzję wątroby świńskiej zaobserwowano, że jeśli zwierzęciu nie podaje się jednocześnie w kroplówce glukozy to wówczas bardzo szybko spada poziom cukru we krwi i powstaje hipoglikemia. Barwiona w tym czasie tkanka wątroby met. PAS na węglowodany nie wykazuje obecności glikogenu.

Niniejszą pracę wykonano celem poznania metabolizmu glukozy u świni z podłączoną drugą wątrobą. Chodziło o odpowiedź na pytanie, czy perfudowana wątroba posiada zdolność syntezy glikogenu oraz w jakim stopniu glikogen, uprzednio nagromadzony w wątrobie jest zużywany podczas samego zabiegu.

### MATERIAŁ I METODYKA

Do doświadczeń użyto świń rasy polskiej, wagi około 30—50 kg. Na dwa dni przed zabiegiem świnię pozostawiały na wysokowęglowodanowej diecie. W dniu

zabiegu rano świni otrzymywały do wypicia osłodzoną wodę. Świnia, od której pobierano wątrobę, czyli świnia-dawca była tak dobrana, aby była o połowę mniejsza od świni biorcy, tj. świni, której podłączono wątrobę.

Świnie-dawcę usypiano eunarconem, a następnie wątrobę in situ przepłukiwano 10 litrami oziębionego do 4°C płynu Ringera z dodatkiem glukozy (około 150—200 mg/100 ml). Po spłynięciu ze zbiornika każdego litra, pobierano płyn wpływający z żyły wątrobowej i badano w nim poziom glukozy oraz glikogenu.

Po przepłukaniu wątroby pobierano narząd w sposób opisany w poprzedniej pracy (3). Czas niedokrwienia ciepłego wynosił zawsze od 4 do 7 minut. Pobrana wątroba była przechowywana w warunkach przepływu 0,2—0,3 ml/g tkanki/min. w temperaturze 10°C przez okres 180 minut w układzie, składającym się z pompy ISL 2, oksygatora Polystan, oraz wymiennika cieplnego.

Do przerwy używano płynu Ringera z dodatkiem glukozy o pH 7,55—7,60. Co godzinę badano w płynie płuczącym wątrobę poziom glukozy i glikogenu, oraz wykonywano biopsję wątroby.

Świnie-dawcę usypiano eunarconem, a następnie wątrobę in situ przepłukiwano medykacji w dawce 0,4 ml/kg wagi ciała. Do dalszego znieczulenia używano halanu w połączeniu z czystym tlenem. Mieszanie tę podawano dotchawczo przez rurkę tracheotomijną. W dalszym etapie u świni-biorcy wykonywano zespolenie żyły wrotnej z żyłą główną dolną, bok do boku i zaciskano więzadło wątrobowo-żołądkowo-dwunastnicze, zamykając w ten sposób cały dopływ krwi do wątroby świni-biorcy. W następnym etapie podłączano przechowywaną przez 3 godziny izolowaną wątrobę homogeną do naczyń biodrowych biorcy wg opisanego przez nas schematu (3). Tak podłączona wątroba była perfudowana przez 6 godzin. W sumie wykonano 7 perfuzji. W pięciu przypadkach świnia od chwili podłączenia homogennej wątroby otrzymywała dożylnie samą glukozę w kroplówce, w dwóch przypadkach do glukozy dodawano 3,5 g chlorku potasowego i 10 j. insuliny.

Glukozę starano się podawać z taką szybkością, ażeby poziom cukru we krwi utrzymywał się na stosunkowo stałym poziomie i nigdy nie był niższy niż 200 mg/100 ml krwi. Poziom cukru we krwi kontrolowano co 30 minut i w zależności od tego regulowano dopływ glukozy.

W czasie 6 godzinnej perfuzji świnia otrzymała około 1,0—1,5 litra 5% glukozy. Poziom glukozy badano, pobierając jednocześnie krew z tętnicy wątrobowej przed wejściem do wątroby i z żyły wątrobowej po przejściu przez wątrobę.

Jednocześnie badano poziom glikogenu we krwi, wątrobie i mięśniu świni-biorcy, oraz wątrobę perfudowanej. Do tego celu pobierano podczas perfuzji z wyżej wymienionych tkanek małe wycinki.

Poziom glukozy we krwi oznaczano met. kolorymetryczną z użyciem orto-toluidyny (2).

Poziom glikogenu we krwi i w tkankach oznaczano met. Van Creveld podaną przez Homolkę (1). Wątrobę i mięsień pobierano na suchy lód, ważono i hydrolizowano wg Tysarowskiego (5). Po degradacji glikogenu do glukozy, oznaczano glukozę met. orto-toluidynową (2).

Próbę bromsulftaleinową w krwi świni-biorcy wykonywano met. Seligsona i wsp. (4).

Wykonana biopsja podłączonej do świni wątroby pozwoliła na histochemiczną ocenę ilości zawartych w tym narządzie węglowodanów. Wykonane preparaty histochemiczne barwiono met. PAS.

## WYNIKI I OMÓWIENIE

Poziomy glikogenu i glukozy w płynie Ringera, płuczącym wątrobę z krwi własnej zamieszczone są tab. I.

Tabela I  
Poziomy glukozy i glikogenu w płynie Ringera, płuczącym wątrobę

Badane wskaźniki	Poziom wyjściowy mg/100 ml	Kolejno wpływające litry płynu Ringera, płuczącego wątrobę									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Glukoza	160	486	240	170	160	130	130	120	140	120	130
Glikogen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

W pierwszym litrze płynu, którym przepłukiwano wątrobę poziom glukozy podwyższył się do 480 mg/100 ml. W dalszych kolejnych porcjach płynu Ringera progresywnie obniżał się, dochodząc do względnie stałego poziomu 140—120 mg/100 ml. We wszystkich dziesięciu porcjach perfudującego płynu nie było zupełnie glikogenu.

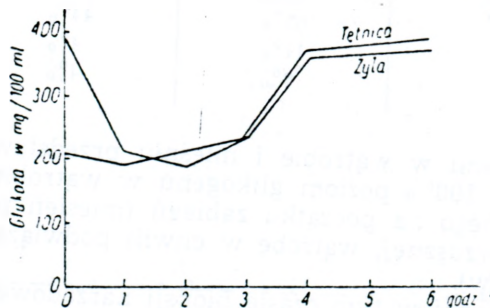
Poziom glukozy i glikogenu w płynie Ringera, którym perfudowano przechowywaną przez okres 3 godzin wątrobę jest zamieszczony w tabeli II.

Tabela II  
Zachowanie się poziomu glukozy i glikogenu podczas przechowywania wątroby

Badane wskaźniki	Poziom wyjściowy mg/100 ml	Godziny		
		1	2	3
Glukoza	140	250	280	350
Glikogen	0	0	0	0

Poziom wyjściowy glukozy w płynie Ringera przed perfuzją wątroby wynosił 140 mg/100 ml. Po 1 godzinie 250, po 2 280 i po 3 350 mg/100 ml. Równolegle do glukozy wykonana próba na glikogen dawała wartości zerowe.

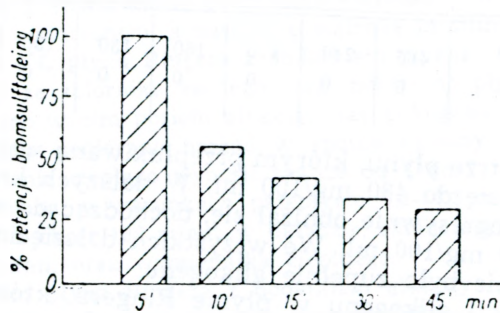
Poziom glukozy we krwi podczas perfuzji został przedstawiony na ryc. 1.



Ryc. 1. Poziom glukozy w krwi tętniczej i żylniej podczas perfuzji.



Badany równolegle do poziomu glukozy poziom glikogenu we krwi został przedstawiony na rycinie 2.



Ryc. 2. Próba bromosulfaleinowa. Retencja barwnika w zależności od czasu perfuzji.

W chwili podłączenia wątroby do świni-biorcy poziom glikogenu w wypływającej krwi wynosił 9 mg/100 ml. Po 1 godzinie od chwili podłączenia poziom ten wzrastał do 26 mg/100 ml, a następnie w 2 i 3 godzinie do około 50 mg/100 ml. W 4 godzinie obserwowano się we wszystkich perfuzjach spadek poziomu glikogenu do około 30 mg/100 ml, a następnie wzrost do 46 mg/100 ml w 5 godzinie i 43 mg/100 ml w 6 godzinie.

Badany w tym czasie poziom glikogenu w homogenacie wątroby perfudowanej, wątroby własnej świni-biorcy i jej mięśnia szkieletowego (wartości średnie z 5 perfuzji) przedstawia tabela III.

Tabela III

Poziom glikogenu podczas 6-godzinnej perfuzji w wątrobie perfudowanej, oraz w wątrobie i mięśniu świni-biorcy

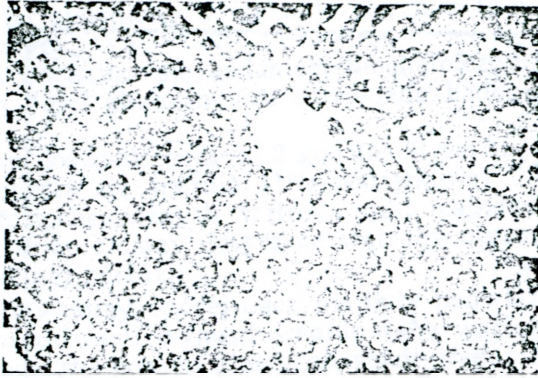
	Wątroba perfudowana	Wątroba świni-biorcy	Mięsień świni-biorcy
Wartości wyjściowe	100%	100%	100%
Po płukaniu	81%	88%	—
Po przechowywaniu	65%	44%	—
Po 2 godz. perfuzji	11%	4%	99%
Po 6 godz. perfuzji	7%	4%	98%

Spadek glikogenu w wątrobie i mięśniu przedstawiono w odsetkach przyjmując jako 100% poziom glikogenu w wątrobie i mięśniu świni-biorcy, oznaczonego na początku zabiegu (mięsień pobierano w chwili otwarcia jamy brzusznej, wątrobę w chwili podwiązania naczyń doprowadzających krew).

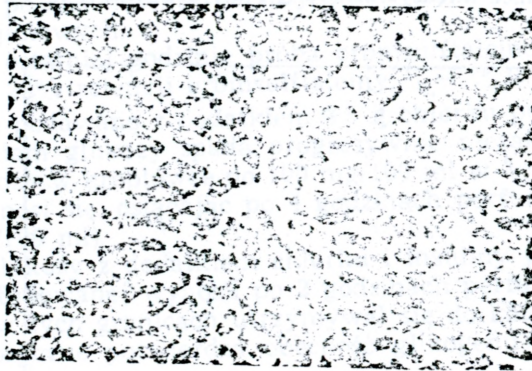
Wyniki wykonanej w tym czasie biopsji narządowej przedstawione są na rycinach 3, 4, 5, 6, 7 i 8.

Wyniki wykonanej biopsji narządowej są w większości badań zgodne z wynikami biochemicznymi.

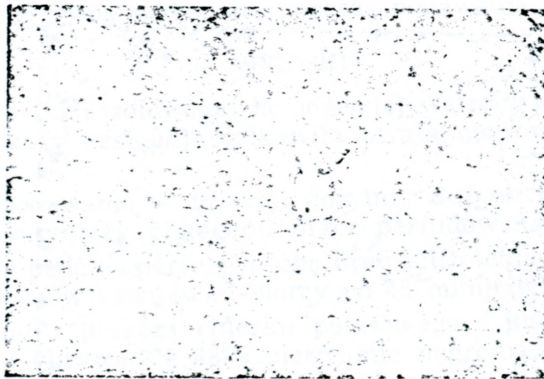
Badaniem biochemicznym po płukaniu wątroby in situ stwierdza się w narządzie ubytek glikogenu wynoszący średnio 19%. W wypływają-



Ryc. 3. Prawidłowa wątroba świńska pobrana przed płukaniem płynem Ringera.



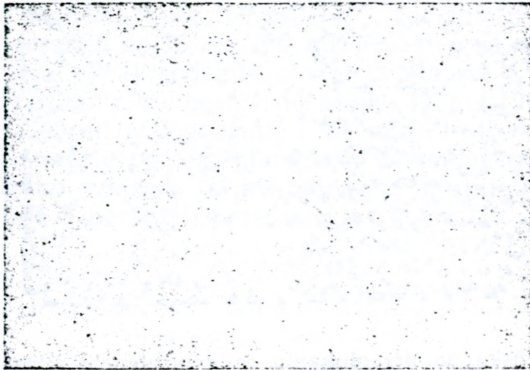
Rys. 4. Wątroba świńska po przepłukaniu in situ płynem Ringera. Po płukaniu glikogen jest zachowany.



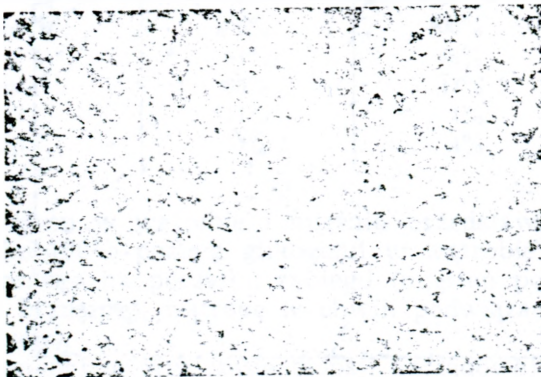
Ryc. 5. Wątroba świńska po prezerwacji. Widoczny znaczny ubytek glikogenu.



Ryc. 6. Wątroba świnińska po 2 godz. perfuzji. W obrębie cytoplazmy komórkowej nie stwierdza się wogóle glikogenu. Ziarnistości PAS dodatnie spotykane są w tkance międzyzrakikowej i dotyczą tkanki łącznej.



Ryc. 7. Wątroba świnińska po 6 godz. perfuzji. Nie obserwuje się resyntezy glikogenu.



Ryc. 8. Wątroba świnińska po 2 godz. perfuzji. Do podawanej iniekcji glukozy dodano insulinę z potasem. Widoczny bardzo nieduży ubytek glikogenu w porównaniu do prawidłowej wątroby świnińskiej.



cym z wątroby płynie Ringera stwierdza się podwyższenie poziomu glukozy, co dodatkowo wskazuje na rozpad glikogenu. Ten niewielki ubytek glikogenu nie został ujawniony w wykonywanych w tym czasie preparatach histochemicznych.

Po przerwacji stwierdza się badaniem biochemicznym średnio tylko 65% początkowej ilości glikogenu, co odpowiada badaniu histochemicznemu.

W dalszym toku doświadczenia po 2 godzinach perfuzji badaniem biochemicznym stwierdza się średnio 11% początkowej ilości glikogenu. W preparatach histochemicznych wątroba jest całkowicie pozbawiona glikogenu. Takie same zmiany dotyczące wątroby obserwuje się po zakończeniu 6-godzinnej perfuzji.

W wątrobie świni-biorcy, której naczynia były podwiązane poziom glikogenu już po przerwacji wynosił średnio 44% wartości początkowej. Po 2 godzinach perfuzji poziom glikogenu spadł średnio do 4% i utrzymywał się w tych granicach przez cały czas perfuzji. Biorąc pod uwagę ciepłotę ciała 37°C i brak przepływu krwi w wątrobie świni-biorcy ten prawie zupełny rozpad glikogenu jest całkowicie uzasadniony.

Glikogen mięśnia świni-biorcy pozostaje przez cały czas na niezmiennym poziomie i po zakończeniu perfuzji praktycznie biorąc nie różni się od wartości wyjściowych.

Wykonana w ostatniej godzinie próba bromsulftaleinowa wykazywała po 45 minutach 28% retencji bromsulftaleiny.

Jeżeli glukozę podawano z dodatkiem 3,5 g chlorku potasowego i 10 j. insuliny, to poziom glukozy spada progresywnie niezależnie od stałego podawania glukozy w kroplówce do 100 mg/100 ml w 3 godzinie perfuzji, a następnie podnosi się, osiągając po 4 godzinach perfuzji wartości wyjściowe (210 mg/100 ml).

Po podaniu glukozy z dodatkiem chlorku i insuliny poziom glikogenu w wątrobie perfudowanej wynosił po 2 godzinach perfuzji 68% wartości wyjściowych i w tych granicach utrzymywał się do końca perfuzji.

Badanie historyczne potwierdza obecność glikogenu w perfudowanej wątrobie.

Wykonana pod koniec perfuzji próba BSP wykazywała 18% retencji barwnika w krwi świni-biorcy po 45 minutach od wstrzyknięcia.

Wydaje się, że dodatek do glukozy potasu z insuliną powoduje lepsze wykorzystanie glukozy przez perfudowaną wątrobę i poprawia jej czynność, co znajduje swoje odbicie w mniejszej retencji bromsulftaleiny w porównaniu z próbą wykonaną podczas podawania samej glukozy.

#### WNIOSKI

1. Podczas perfuzji izolowanej homogennej wątroby świńskiej pomimo podawania glukozy następuje całkowita utrata nagromadzonego w niej glikogenu.

2. Pomimo podawania w iniekcji dożylniej dużych ilości glukozy nie stwierdza się resyntezy glikogenu przez perfudowaną wątrobę.

3. Wykonana podczas perfuzji próba bromsulftaleinowa wykazuje 28% retencji barwnika w krwi świni-biorcy po 45 minutach.

4. Po podaniu z glukozą chlorku potasowego i insuliny w wątrobie perfudowanej wykrywa się 68% pierwotnie nagromadzonego glikogenu, a retencja bromsulftaleiny po 45 minutach od chwili podania barwnika wynosi tylko 18%.

М. Росновска, В. Ольшевски, В. Ровиньски, Е. Полянски,  
Г. Лукасевич, А. Завадзки

### ПОПЫТКА ОЦЕНКИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА В ПЕРФУДИРОВАННОЙ ПЕЧЕНИ СВИНЬИ

#### Содержание

Авторы исследовали метаболизм глюкозы и гликогена при гомогенной перфузии свиной печени, консервированной собственным методом. Во время 3-часового консервирования из печени вымывается незначительное количество гликогена предварительно разложенного для глюкоза, в результате чего происходит повышение гликемии жидкости Рингера, перфудирующей печень. После подключения печени к свиные-реципиенту в течение первых двух часов происходит освобождению почти всего накопленного в печени гликогена, что подтверждается гистохимическими исследованиями пунктатов печени, окрашиваемых по методу ПАСК. В венозной крови свиные-реципиента происходит в это время повышение уровня глюкоза и гликогена. В собственной печени свиные-реципиента, в которой были перевязаны сосуды, гликоген понижается до 4% исходного значения, принятого как 100%. Уровень гликогена в поперечнополосатых мышцах удерживается на постоянном уровне за все время перфузии. Выполненная в последнем часу перфузии бромсульфалеиновая проба обнаружила 28% ретенции пигмента. Когда к внутривенно вводимой глюкозе прибавлялся хлористый калий и инсулин тогда наблюдалась только незначительная потеря гликогена в перфудированной печени, что было подтверждено путем гистохимического исследования. Бромсульфалеиновая проба у свиные-реципиента обнаружила лишь 18% ретенции бромсульфалеина после истечения 45 минут.

M. Rosnowska, W. Olszewski, W. Rowiński, J. Polański,  
H. Łukasiewicz, A. Zawadzki

### THE TRIAL OF CARBOHYDRATE METABOLISM STUDY IN PERFUSED LIVER OF PIG

#### Summary

The metabolism of glucose and glycogen in homogenous porcine liver during perfusion was studied. The liver was preserved according to authors own technique. During 3-hours perfusion the small amount of glycogen (previously changed into glucose) was eluted and caused the increase of glycaemia of perfusing Ringer's fluid. In the first two hours after connexion of perfused liver to donorpig liver the liberation of almost all of the glycogen stored was confirmed by the histochemical investigation of liver material obtained by oligobiopsy and stained with PAS method. In the same time the increase of glucose and glycogen concentrations in venous blood donor-pig were observed. In the liver of donor-pig in which the blood vesels were closed there was decrease of glycogen to 4% of instial value (100%). The glycogen concentration in straited muscles was constant during perfusion. Performed in the last hour of perfusion bromsulftalein test shown 28% of dye retention Addition of potassium chloride and insulin to the intravenous glucose infusion resulted in only very small deficit of glycogen in perfused liver. This fract was confirmed by histochemical examination. The bromsulftalein te st performed after 45 minutes in donorpig shiwn only 18% dye retention.



## PIŚMIENNICTWO

1. *Homolka J.*: Diagnostyka biochemiczna. PZWL, Warszawa, 1961. — 2. *Kryger B.*: Wiad. Lek., 1963, 16, 1133. — 3. *Nielubowicz J.* i wsp.: Pol. Przegl. Chir., 1969, 1, 1. — 4. *Seligson D., Marino J., Dodson E.*: Clin. Chem., 1957, 3, 638. — 5. *Tysarowski W.*: Biochemia praktyczna. PZWL, Warszawa, 1968.

Wpłynęło dnia 11. IV. 1970

Adres autorów: Zakład Chirurgii Doświadczalnej i Transplantologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN w Warszawie.