

EUGENIUSZ MIĘTKIEWSKI, L. STANISZEWSKI, E. ŁEMPICKI, A. MANDAT

BADANIA PORÓWNAWCZE NAD AKTYWNOŚCIĄ TRANSAMINAZ WE KRWI PODCZAS WSTRZĄSÓW DOŚWIADCZALNYCH *

DONIESIENIE I. AKTYWNOŚĆ TRANSAMINAZ W PRZEBIEGU WSTRZĄSU
URAZOWEGO NOBLE-COLLIPA I WE WSTRZĄSIE HISTAMINOWYM

Z Zakładu Fizjologii A. M. w Szczecinie

Kierownik: prof. dr *E. Miętkiewski*

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Szczecinie

Kierownik: prof. dr *E. Łempicki*

Za najważniejszą przyczynę w rozwoju każdego wstrząsu uważa się nadal długotrwały stan niedotlenienia tkanek.

Na początku wstrząsu przeważa zawsze pobudzenie, zwiększony metabolizm i wzmożone zapotrzebowanie na tlen, którego dowóz do komórek równocześnie się pogarsza. Zmniejszona dostawa tlenu staje się przyczyną dalszych zmian w czynności komórek, prowadząc wreszcie do ich rozpadu, a w każdym razie do postępującego rozkojarzenia pośredniej przemiany materii, u podstaw której leżą bardzo liczne, chociaż w tym aspekcie słabo jeszcze poznane, procesy enzymatyczne.

Biochemiczne badania mechanizmów wstrząsowych bynajmniej nie są jeszcze skończone, a nawet śmiało powiedzieć można, że mają jeszcze bardzo wiele przed sobą, szczególnie w zakresie lepszego poznania dynamiki i znaczenia procesów enzymatycznych.

Skoro pierwotną przyczyną mechanizmów wstrząsowych ma być niedotlenienie komórek i tym spowodowane zmiany ich czynności, przepuszczalności lub struktury aż do rozpadu włącznie, to najłatwiej wiązać je z rolą takich fermentów, które w podobnych okolicznościach powinny uwalniać się z komórek, a gromadzić w płynach ustrojowych i we krwi. W tym aspekcie na pierwszy plan wysunąć trzeba transaminazy. Są to bowiem enzymy zawarte w rozpuszczalnej frakcji komórek, skąd uwalniają się do płynów ustrojowych bardzo łatwo, zarówno przy uszkodzeniu strukturalnym, jak i wskutek czynnościowego zwiększenia przepuszczalności błon komórkowych, np. z powodu niedotlenienia [6, 10, 17]. Inni autorzy uwa-

* Praca wykonana z zasiłku Komitetu Patogenezy Wstrząsów VI Wydż. Nauk Med. PAN.

zają, że transaminazy zawarte są w jądrze komórkowym i w mitochondriach, skąd uwalniają się nie tylko wskutek rozpadu komórek, ale już przy bardzo lekkich uszkodzeniach czynnościowych, które mogą być jeszcze odwracalne [8].

Toteż aktywność transaminaz we krwi zwiększa się w wielu stanach chorobowych i w różnych warunkach doświadczalnych zależnie od rodzaju komórek specjalnie narazonych na działanie czynników uszkadzających. Największe znaczenie rozpoznawcze ma jednak oznaczanie aktywności transaminaz we krwi podczas zawału serca, uszkodzenia wątroby, trzustki, a także w chorobie reumatycznej i insultach mózgowych. Natomiast w dziedzinie laboratoryjnej z zagadnieniem wstrząsów łączą się te daleko mniej liczne prace, które zajmują się już aktywnością transaminaz doświadczalnego niszczenia tkanek, sztucznej ischemii, uszkadzającego działania energii promienistej, przeciążania systemu nerwowego, zaburzeń hormonalnych itp. [1, 3, 11, 14, 17].

Transaminazy łączą się ze wstrząsem również i pod względem czynnościowym, gdyż biorą udział w pośredniej przemianie materii na pograniczu białek i węglowodanów. W przypadku przewagi procesów katabolicznych, gdy synteza białek nie nadąza za wzmożonym ich rozpadem, zwiększa się aktywność transaminaz, które ułatwiają wówczas powstawanie białek z cukrowców. Odwrotną rolę spełniają transaminazy w przypadku przewagi procesów anabolicznych. W tych warunkach dopływ kwasów aminowych jest niepotrzebny i dlatego mała aktywność transaminaz ogranicza ich podaż [2]. Najwięcej uwagi poświęca się obecnie transaminazie szczawiowo-octowo-glutaminowej SOGT oznaczanej najczęściej skrótowo GOT (*glutamic-oxalaetic-transaminase*) i pyrogro-nowo-glutaminowej PGT czyli GPT (*glutamic-pyruvic-transaminase*). Pierwsza z nich katalizuje przenoszenie grupy aminowej z kwasu asparaginowego na kwas α -ketoglutazarowy, przez co powstaje kwas szczawiowo-octowy i glutaminowy, a druga robi to samo odnośnie kwasu α -ketoglutazarowego i alaniny, z których powstaje kwas glutaminowy i pyrogro-nowy. Każda z tych reakcji może również przebiegać w kierunku przeciwnym.

Wiadomo więc, że aktywność transaminaz we krwi wzrasta przede wszystkim na skutek martwicy lub zmienionej przepuszczalności błon komórkowych w mózgu, nerkach, wątrobie, sercu i mięśniach szkieletowych [4, 5, 7, 9, 12, 15, 16], gdzie podobne zjawiska występują też jako skutek długotrwałego niedotlenienia w różnych formach wstrząsów klinicznych bądź doświadczalnych, a równocześnie niewątpliwym zmianom ulega metabolizm węglowodanów i białek, na pograniczu których w obu kierunkach dokonują się enzymatyczne procesy przeaminowania.

W tym zestawieniu oczywistymi wydają się nam przynajmniej dwa pytania, a mianowicie: czy aktywność transaminaz we krwi wiąże się

w ogóle w jakiś sposób z patogenezą wstrząsów, oraz czy w różnych wstrząsach aktywność tych enzymów zachowuje się jednakowo. Rozważań na ten temat ani odpowiednich prac doświadczalnych nie znaleźliśmy w piśmiennictwie i dlatego podjęliśmy szerzej zaplanowane badania własne, których część stanowi obecna praca. Przez całość tych badań chcieliśmy się przyczynić do lepszego zrozumienia biochemicznych, a zwłaszcza enzymatycznych mechanizmów, jakie bez wątpienia determinują ważniejsze objawy w różnych formach wstrząsu. Na tej drodze chcielibyśmy też szukać nowszego materiału porównawczego, jakiego bardzo jeszcze potrzeba, aby uporządkować zawiły szereg pojęć w tak ważnej i rozległej dziedzinie patofizjologii, którą obejmuje się wspólnym mianem wstrząsu.

METODYKA

Do doświadczeń użyliśmy znacznie więcej niż 250 białych szczurów i 5 królików, gdyż podane liczby nie uwzględniają wielu doświadczeń, które nie udały się z różnych przyczyn, np. nagła śmierć królików po wstrzyknięciu histaminy lub wcześniejsze padanie szczurów po wyjęciu z bębna Noble-Collipa niż to wynika z zaplanowanych terminów pobierania krwi w poszczególnych grupach. W ogóle używaliśmy zwierząt nie rasowych, obu płci, dojrzałych we własnej hodowli. We krwi szczurów śledziliśmy jak zmienia się aktywność obu transaminaz w różnych okresach po wywołaniu wstrząsu urazowego przez potłuczenie w bębnie Noble-Collipa. Króliki służyły nam do takich samych badań nad transaminazami w przebiegu ostrego wstrząsu histaminowego.

Krew pobieraliśmy do badania tak ostrożnie, aby nie dopuścić do hemolizy, przez co uwolniona z krwinek transaminaza zwiększyłaby aktywność w osoczu. U królików osiągalniśmy to przez nakłucie żyły brzeżnej ucha, a szczury usypialiśmy eterem, aby po rozcięciu powłok i wyjęciu jednego płuca pobierać do pipety krew płynącą wprost do jamy klatki piersiowej podczas skrwawiania.

Aktywność transaminazy szczawiowo-octowo-glutaminowej — SOGT — oraz pyrogronowo-glutaminowej — PGT — oznaczaliśmy kolorymetryczną metodą Reitmana i Frankela [13].

Wstrząs urazowy u szczurów wywoływaliśmy metodą Noble-Collipa [11] przy pomocy bębna własnej konstrukcji, który obracał się przez 15 minut z szybkością 45/min. W tych warunkach każde zwierzę otrzymywało 675 uderzeń i przeżywało ciężki wstrząs, który w 70% kończył się śmiertelnie. Zwierząt, które ginęły we wstrząsie przed terminem pobrania krwi do badania na aktywność transaminaz, nie uwzględnialiśmy w liczbach podanych na początku opisu metody badań. Spośród właściwych zwierząt doświadczalnych w grupie I 25 szczurów badaliśmy przed wywołaniem wstrząsu, aby ustalić własne wartości normalne, z którymi porównywać będziemy odpowiednie aktywności transaminaz w poszczególnych seriach po 25 zwierząt badanych w następujących okresach po wyjęciu z bębna Noble-Collipa: 30 minut, 2 i 6 godz. oraz 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7 dni.

Wstrząs histaminowy wywoływaliśmy w II grupie doświadczalnej przez dożylnie wstrzyknięcie 0,25 mg/kg histaminy Hofman La Roche w 5 ml fizjologicznego roztworu soli kuchennej. W pierwszych minutach po wstrzyknięciu zjawiały się typowe objawy wstrząsu histaminowego, który w wielu wypadkach skończył się śmiercią.

Tych zwierząt nie umieściliśmy w opisie materiału doświadczalnego, gdyż mogliśmy uwzględnić tylko zwierzęta, które przeżyły przynajmniej tak długo, aby dostarczać krwi do badania w następujących okresach po wstrzyknięciu histaminy: 15 i 60 minut oraz 2, 4 i 6 godzin.

Uzyskane wyniki opracowywaliśmy statystycznie w ten sposób, że z pojedynczych pomiarów w każdej grupie obliczaliśmy średnią arytmetyczną M , średnie odchylenie $\pm m$ i średni błąd średniej arytmetycznej $sig. M$. Porównując następnie średnie wartości uzyskane w poszczególnych okresach po wywołaniu wstrząsu z średnią obliczoną dla kontrolnych zwierząt nie poddanych jeszcze wstrząsowi, uzyskiwaliśmy różnice, które dowodzą zmian aktywności badanych transaminaz w przebiegu odpowiedniego wstrząsu. Do statystycznej oceny tych różnic posługiwaliśmy się wskaźnikiem istotności t . Jako znamienne przyjmujemy te różnice, których wskaźnik istotności jest większy od 2.

WYNIKI

Pierwsza grupa naszych badań wykonana na 250 szczurach wybranych spośród znacznie większej liczby zwierząt, które przeżyły ciężki wstrząs urazowy typu Noble-Collipa i następujący po nim okres 7 dni rekonwalescencji, dowodzi bardzo wielkiego wzrostu aktywności transaminaz we krwi, którego szczyt przypada w czasie od 30 minut do 2 godzin po zadaniu urazu. Godnym podkreślenia wydaje się w tym wypadku fakt, że we wstrząsie Noble-Collipa nie mamy do czynienia z pierwotnym uszkodzeniem mięśni ani wątroby, a jednak niezwykle silnie powiększa się aktywność transaminazy zarówno pyrogronowo-glutaminowej jak i szczawiowo-octowo-glutaminowej. Toteż łatwo nasuwa się przypuszczenie, że w tym rodzaju wstrząsu cierpi szczególnie ośrodkowy układ nerwowy i system gruczołów dokrewnych, gdyż nieznieczulane zwierzęta poddaje się bolesnemu potłuczeniu i dlatego rozwija się wstrząs, który bardzo wcześnie manifestuje się wybitnymi zmianami biochemicznymi wywołanymi niewątpliwie w znacznej mierze na drodze nerwowej. Skąd i w jaki sposób podczas tego wstrząsu tak szybko i obficie gromadzą się transaminazy we krwi, usiłujemy wyjaśnić w oddzielnych badaniach, które są w toku.

Doświadczeń tych nie umiemy porównać z podobnymi, gdyż nie znaleźliśmy takich w dostępnym nam piśmiennictwie. Toteż jako pewną nowość podkreślamy, że aktywność transaminazy pyrogronowo-glutaminowej, która u naszych szczurów wynosiła przeciętnie 58,6 jednostek na 1 ml surowicy w warunkach prawidłowych, już po 30 minutach od wywołania wstrząsu urazowego Noble-Collipa wzrosła na 1378 jednostek, czyli w tym bardzo krótkim czasie powiększyła się około dwudziestokrotnie. Widać to w tabeli 1a i b. Rzeczywiście wysoki poziom tej aktywności utrzymywał się przez pierwszych 6 godzin po wywołaniu wstrząsu, po czym dochodziło do jej zmniejszenia, co widać najlepiej w 6 dobie po wywołaniu wstrząsu, kiedy osiągnęła wartość mniejszą niż w normie tzn. 30 jednostek na 1 ml

Tabela 1. Aktywność transaminaz krwi szczurów w warunkach prawidłowych i w różnych okresach wstrząsu urazowego typu Noble-Collipa.

Table 1. Activity of transaminases in the blood of rats under normal conditions and at various stages of the Noble-Collip trauma shock.

A PGT=transaminaza pyrogronowo-gluta- minowa 1)	War- tości prawi- dłowe 2)	Czas po zadaniu urazu w bębnie Noble-Collipa 3)										
		minu- ty 4)	godziny 5)			d o b y 6)						
			30	2	6	1	2	3	4	5	6	7
Średnia arytmetyczna dla wszystkich zwierząt 7) M	58.6	1378	1375	1244	319.2	80.2	45	32	39	30	33	
Średni błąd średniej 8) sig M	10	92.5	146.2	71.9	18.6	5.7	3.5	2.4	5.0	4.0	2.7	
Wskaźnik istotności różnic między grupami 2—7 a 1 t 9)		12	8.4	14.4	9.3	2.0	1.3	2.5	1.9	2.8	2.5	
Liczba zwierząt w grupie pomiarów 10)	25	25	25	25	25	25	25	25	10	10	10	
Grupa pomiarów 11)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
B												
SOGT=transaminaza szczawiowo-octowo-glutaminowa 12)												
Średnia arytmetyczna dla wszystkich zwierząt 7) M	145	1629	1890	1130	626.3	113.3	93	76	62.6	32	45	
Średni błąd średniej 8) sig M	13	103.5	134.7	72.8	93	18.4	12.1	3	6.5	4.3	2.6	
Wskaźnik istotności różnic między grupami 2—7 a 1 t 9)		5	5.4	4.5	4.5	3.14	2.0	4.3	6	8.6	7.6	
Liczba zwierząt w grupie pomiarów 10)	25	25	25	25	25	25	25	25	10	10	10	
Grupa pomiarów 11)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	

PGT Pyruvic-glutamic transaminase 1); Normal values 2); Time after infliction of the trauma in the Noble-Collip drum 3); Minutes 4); Hours 5); Days 6); Arithmetic mean for all animals 7); Standard error of average sig M 8); Index of statistical significance of the differences between the groups 9); Number of animals in the group 10); Group 11); SOGT Oxalic-acetic-glutamic transaminase 12).

surowicy, czyli około 50% mniej niż przed wywołaniem wstrząsu. Transaminaza szczawiowo-octowo-glutaminowa zwiększyła swą aktywność w tych samych warunkach szczególnie wyraźnie po 2 godzinach od wywołania wstrząsu Noble-Collipa, gdyż wzrosła w tym czasie ze 145 na

Tabela 2. Aktywność transaminaz krwi u królików w warunkach prawidłowych i w różnych okresach wstrząsu histaminowego.

Table 2. Activity of transaminases in the blood of rabbits under normal conditions and at various stages of histamine shock *.

A PGT=transaminaza pyrogronowo-glutaminowa	Wartości prawidłowe	Czas po dożylnym wstrzyknięciu 0.25 mg/kg histaminy				
		15'	60'	2h	4h	6h
Średnia arytmetyczna dla wszystkich zwierząt M	43.6	50.8	50.4	43.6	47.6	48.4
Średni błąd średniej sig M	2.6	3.5	4.1	5.5	3.7	4.2
Wskaźnik istotności różnic między grupami 2—7 a 1	t	1.8	1.4	0	0.86	1.1
Liczba zwierząt w grupie pomiarów	5	5	5	5	5	5
Grupa pomiarów	1	2	3	4	5	6
B						
SOGT=transaminaza szczawiowo-octowo-glutaminowa						
Średnia arytmetyczna dla wszystkich zwierząt M	42	49.2	38.8	39.6	36.0	36.8
Średni błąd średniej sig M	4.6	8.0	13.1	6.5	5.6	5.6
Wskaźnik istotności różnic między grupami 2—7 a 1	t	0.77	0.23	0.33	0.83	0.72
Liczba zwierząt w grupie pomiarów	5	5	5	5	5	5
Grupa pomiarów	1	2	3	4	5	6

* Captions as in Table 1.

1890 jednostek w 1 ml surowicy, to znaczy, że powiększyła się około dziesięciokrotnie. Podobnie jak było z transaminazą pyrogronowo-glutaminową, również szczawiowo-octowo-glutaminowa zmniejszała swą aktywność w następnych okresach po wywołaniu wstrząsu i 6 dnia od tego czasu osiągnęła już 32 jednostki w 1 ml surowicy, co stanowi mniej niż $\frac{1}{3}$ wartości prawidłowej z okresu przed wywołaniem wstrząsu. Mimo bardzo dużych różnic u poszczególnych zwierząt, zmiany powyższe trzeba uznać za niewątpliwie istotne, gdyż statystyczny wskaźnik znamienności tych

różnic waha się w granicach od 5,4 do 12, a więc jest przekonywująco większy niż 2.

W drugiej grupie doświadczeń przekonaliśmy się znów bez wątpienia, że aktywność transaminaz we krwi królików nie ulega istotnym zmianom podczas wstrząsu histaminowego. Liczbowe zestawienie wyników tych badań przedstawia tab. 2a i b. Z liczb tych wynika, że średnia aktywność transaminazy pyrogronowo-glutaminowej wynosiła w normie 43,6 jednostek na 1 ml surowicy, a w różnych odstępach czasu po wstrzyknięciu wstrząsowej dawki histaminy zwiększała się tak niewyraźnie, że wskaźnik znamienności tych różnic był zawsze znacznie mniejszy od 2. Jeszcze mniejszym zmianom podlegała w tych doświadczeniach aktywność transaminazy szczawiowo-octowo-glutaminowej, która z 42 jednostek w warunkach prawidłowych zmalała do 36 jednostek po 4 godzinach od wywołania wstrząsu.

WNIOSKI

Na podstawie przedstawionych badań wysnuć można następujące wnioski:

1. Aktywność transaminaz we krwi zmienia się bardzo wyraźnie w przebiegu wstrząsu urazowego u szczurów, a nie wykazuje istotnych zmian po wywołaniu wstrząsu histaminowego u królików.

2. Maksymalny wzrost aktywności transaminazy pyrogronowo-glutaminowej w urazowym wstrząsie Noble-Collipa u szczurów przypada już po 30 minutach od zadania urazu i jest około dwudziestokrotny. Aktywność transaminazy szczawiowo-octowo-glutaminowej wzrasta w tych samych warunkach około dziesięciokrotnie, osiągając wartość maksymalną w drugiej godzinie wstrząsu. Wartości te zmniejszają się następnie szybko, dochodząc do normy między 2 i 3 dniem po wywołaniu wstrząsu, ale przez wiele dni później utrzymują się jeszcze w granicach niższych niż to było prawidłowo przed wywołaniem wstrząsu.

3. Aktywność obu transaminaz we krwi królików nie zmienia się istotnie bezpośrednio ani też później po wstrzyknięciu wstrząsowej dawki histaminy.

PIŚMIENNICTWO

1. Albaum H., Milch L.: Amer. J. Physiol. 1957, 190, 533.
2. Beaton J., Curry B., Veen M.: Arch. Biochem. Biophys. 1957, 70, 288.
3. Chinsky M., Schmagronoff G., Sherry S.: J. Lab. Clin. Med. 1956, 47, 108.
4. La Due J., Wróblewski F., Karmen A.: Science 1954, 120, 497.
5. Egleton M., Richardson K., Schild H., Winton F.: J. Exper. Physiol, 1953, 173, 253.
6. Gibiński K., Kokot F.: Pol. Tyg. Lek. 1957, 33, 1290.

7. Gibiński K., Kokot F.: *Pol. Tyg. Lek.* 1957, 48, 1841.
8. Hübl P., Wewalka F.: *Wiener Z. f. Innere Medizin* 1958, 39, 10, 424.
9. Magalini S., Stefanini M.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1956, 91, 404.
10. Merrill J., Lemley-Stone, Meneely G.: *Amer. J. Physiol.* 1957, 190, 522.
11. Noble R., Collip J.: *Quart. J. Exp. Physiol.* 1942, 31, 187.
12. Nydick T., La Due J.: *Circulation* 1955, 12, 795.
13. Reitmann S., Frankel S.: *Amer. J. Clin. Pathol.* 1957, 28, 56.
14. Rudolph L., Schafer J., Dutton R., Lyons R.: *J. Clin. Inv.* 1955, 34, 960.
15. Wróblewski F., La Due J.: *J. Lab. Clin. Med.* 1954, 44, 958.
16. Wróblewski F., La Due J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1956, 91, 569.
17. Żelénka V., Zitka W., Zborowsky J.: *Pol. Tyg. Lek.* 1960, 4, 121.

Otrzymano: 29. 11. 1960.

Adres autorów: Zakład Fizjologii Akad. Med. w Szczecinie, ul. Powstańców 72.