

## Μεταβολές των ενζύμων κατά τη διάρκεια παρατεταμένης οξείας ισχαιμίας και επαναιμάτωσης του μυϊκού ιστού (πειραματική μελέτη σε σκύλους)

Απ. Καμπαρούδης, Θ. Γερασιμίδης, Δ. Καραμάνος, Χρ. Πασίνης, Αθ. Σακαντάμης

Β' Χειρουργική Προπαιδευτική Κλινική Α.Π.Θ., Ιπποκράτειο Γ.Π.Ν. Θεσσαλονίκης

Η οξεία ισχαιμία των ιστών ακολουθείται από διαταραχές του ενεργειακού τους φορτίου, από ηλεκτρολυτικές διαταραχές, αλλά και από διαταραχές της οξεοβασικής ισορροπίας και των ενζυμικών συστημάτων που συμμετέχουν στην εξέλιξη των διαφόρων λειτουργιών των κυττάρων. Η επαναιμάτωση συνήθως αναστέλλει τις παραπάνω διεργασίες, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να τις επιδεινώσει και να οδηγήσει σε μόνιμες βλάβες των ιστών.

Σκοπός της πειραματικής αυτής εργασίας ήταν: η εκτίμηση των μεταβολών της γλουταμινοξαλοξικής τρανσαμινάσης (GOT), της γλουταμινοπυροσταφυλικής τρανσαμινάσης (GPT) και της κρεατινοφωσφοκινάσης (CPK) σε παρατεταμένη οξεία ισχαιμία του μυϊκού ιστού διάρκειας 12 ωρών και αντιστοίχου χρόνου επαναιμάτωσης, τόσο στο αίμα, όσο και στα μυϊκά κύτταρα και η διερεύνηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης των μεταβολών αυτών, ως παραμέτρων εκτί-

μησης του βαθμού της ισχαιμικής βλάβης αλλά και της αποκατάστασής της μετά την επαναιμάτωση. Χρησιμοποιήθηκαν 15 μη καθαρόαιμοι σκύλοι στο δεξιό οπίσθιο σκέλος των οποίων προκλήθηκε πλήρης οξεία ισχαιμία διάρκειας 12 ωρών και ακολούθησε επαναιμάτωση αναλόγου χρόνου.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων συμπεραίνεται ότι μετά από παρατεταμένη οξεία ισχαιμία των σκελετικών μυών οι μεταβολές της GOT και της GPT δεν μπορούν να αποτελέσουν δείκτη εκτίμησης του βαθμού της ισχαιμικής βλάβης και της δυνατότητας αποκατάστασής της με την επαναιμάτωση. Όμως οι μεταβολές της CPK στη συστηματική κυκλοφορία ( $115,6 \pm 84,6$  U/L  $\rightarrow$   $582,15 \pm 114,9$  U/L) και στο φλεβικό αίμα του πάσχοντος σκέλους ( $105,259 \pm 89,56$  U/L  $\rightarrow$   $651,7 \pm 131,2$  U/L) μπορούν επιλεκτικά να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης ισχαιμικής βλάβης.  
*Ιπποκράτεια 2001, 5 (1): 13-22*

Τα αμινοξέα αποτελούν απαραίτητα συστατικά των κυττάρων γιατί είναι το βασικό στοιχείο βιοσύνθεσης των πρωτεϊνών, ενώ συμμετέχουν και στη σύνθεση άλλων σημαντικών ενώσεων όπως νουκλεοτιδίων, πορφυρινών, κρεατίνης, μελανίνης, σφιγγοσίνης, ορμονών και βιομορίων. Η περίσσεια των αμινοξέων δεν μπορεί να αποθηκευτεί ως έχει. Ένα πολύ μικρό μέρος αποβάλλεται με τα ούρα, ενώ το μεγαλύτερο τμήμα χρησιμοποιείται ως καύσιμο, αφού πρώτα υποστεί απαμίνωση ή τρανσαμίνωση. Τόσο στην απαμίνωση όσο και στη τρανσαμίνωση απαραίτητη είναι η παρουσία συγκεκριμένων ενζύμων. Η GOT και η GPT, είναι από τις πλέον γνωστές τρανσαμινάσες, που καταλύουν τις αντιδράσεις τρανσαμί-

νωσης του L-ασπαρτικού /οξαλοξικού και της L-αλανίνης/ L-γλουταμικού. Η GOT βρίσκεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς του σώματος, ενώ η GPT βρίσκεται κυρίως στο ήπαρ και λιγότερο στους σκελετικούς μυς. Βλάβη των κυττάρων οδηγεί σε απελευθέρωση αυτών των τρανσαμινάσων στο αίμα και μεταβολή των επιπέδων τους τόσο στη συστηματική κυκλοφορία όσο και στον ενδοκυττάριο χώρο<sup>1-3</sup>.

Είναι γνωστό ότι η βασική πηγή ενέργειας των κυττάρων είναι η τριφωσφορική αδενοσίνη ATP που προέρχεται είτε από την μεταβολική οδό της γλυκόλυσης, είτε από την διάσπαση της φωσφοκρεατίνης. Η φωσφοκρεατίνη (PCr) βρίσκεται σε τριπλάσια ποσότητα μέσα στα κύτταρα των σκε-

λετικών μυών από ότι η τριφωσφορική αδενοσίνη (ΑΤΡ) και για να μετατραπεί σε ΑΤΡ είναι απαραίτητη η παρουσία και δράση του ενζύμου CPK. Το πόσο σπουδαία δεξαμενή ενέργειας για την παραγωγή έργου από τον μυ είναι η φωσφοκρεατίνη και το πόσο απαραίτητη είναι η παρουσία της CPK αποδεικνύεται από πειράματα αναστολής της δράσης της CPK. Μετά από λίγες συστολές η συνέχιση του έργου είναι αδύνατη γιατί η ΑΤΡ έχει ήδη εξαντληθεί και είναι αδύνατη η αναπαραγωγή της από την εγκλωβισμένη PCr. Επίσης από βιοψίες μυών που έγιναν κατά την παραγωγή μυϊκού έργου τα αποθέματα της PCr μειώνονταν σταδιακά, ενώ το σύμπλεγμα ΑΤΡ/ΑΔΡ παρέμενε σταθερό, κατάσταση που σημαίνει την άμεση ανασύνθεση της τριφωσφορικής αδενοσίνης από την φωσφοκρεατίνη με την δράση της CPK. Η CPK βρίσκεται κυρίως στους γραμμωτούς μυς και στον εγκέφαλο. Διαταραχές που συμβαίνουν στις μεταβολικές οδούς των κυττάρων οδηγούν και σε μεταβολές των επιπέδων της CPK τόσο στη συστηματική κυκλοφορία, όσο και στον ενδοκυττάριο χώρο<sup>1-6</sup>.

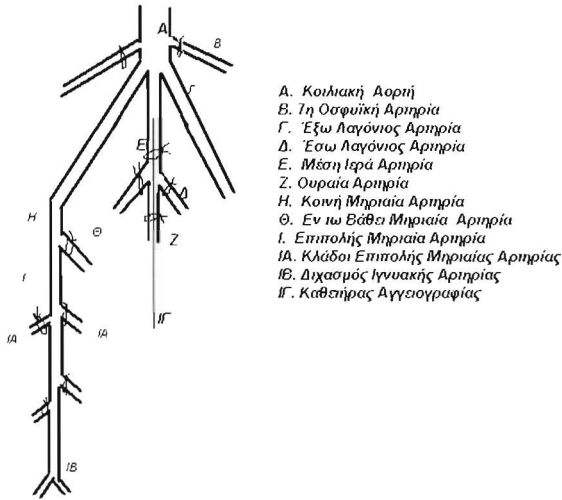
Η οξεία ισχαιμία των σκελετικών μυών οδηγεί από τη μια μεριά σε διαταραχές των μεταβολικών οδών των κυττάρων, από την άλλη δε σε διαταραχή της δομής των κυτταρικών στοιχείων με αποτέλεσμα την μεταβολή των επιπέδων των διαφόρων ενώσεων και ενζύμων. Η επαναιμάτωση μπορεί να αποκαταστήσει αυτές τις διαταραχές. Σε ορισμένες περιπτώσεις όμως, αυτή καθεαυτή η επαναιμάτωση μπορεί να οδηγήσει σε επιδείνωση των ισχαιμικών βλαβών και σε μη αναστρέψιμη κατάσταση. Η εξέλιξη αυτή εξαρτάται από τον βαθμό και τον χρόνο της ισχαιμίας και από το είδος του ιστού<sup>6-9</sup>. Παρά το πλήθος κλινικών και πειραματικών μελετών αναζητούνται ακόμη αξιόπιστοι δείκτες εκτίμησης της ισχαιμικής βλάβης αλλά και της δυνατότητας αποκατάστασής της με την επαναιμάτωση.

Σχεδιάσαμε την πειραματική μελέτη αυτή με σκοπό την μελέτη των μεταβολών της GOT, της GPT και της CPK κατά τη διάρκεια δωδεκάωρης οξείας ισχαιμίας του μυϊκού ιστού και του αντίστοιχου χρόνου επαναιμάτωσης, και την διερεύνηση της δυνατότητας χρησιμοποίησης των μεταβολών αυτών, ως δεικτών του βαθμού της ισχαιμικής βλάβης και της πιθανότητας αποκατάστασής της με την επαναιμάτωση.

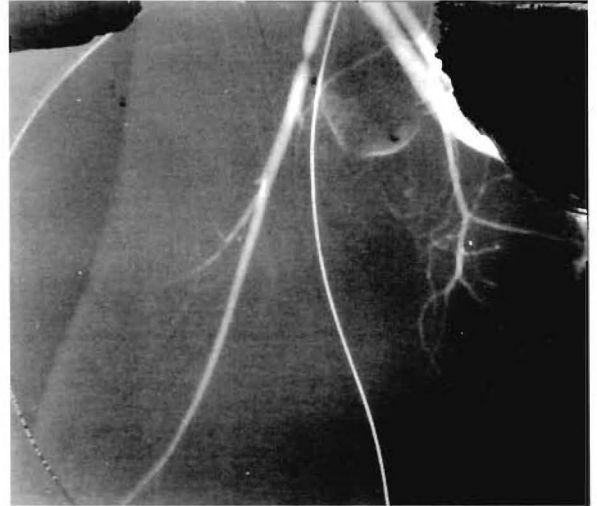
#### ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ

Για να γίνει η μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 15 μη καθαράιμοι σκύλοι βάρους 15-20 κιλών. Στο

δεξιό οπίσθιο σκέλος κάθε πειραματόζωου προκαλούνταν, με περίσφυξη της κοινής μηριαίας αρτηρίας, οξεία ισχαιμία διάρκειας δώδεκα ωρών και στη συνέχεια επαναιμάτωση αντιστοίχου χρόνου. Το αριστερό οπίσθιο σκέλος των πειραματόζων χρησιμοποιούνταν ως μάρτυρας. Συγκεκριμένα οι χρόνοι της επέμβασης του πειραματικού πρωτοκόλλου είχαν ως εξής: μετά από γενική αναισθησία εκτελούνταν επιμήκης τομή στην δεξιά βουβωνική χώρα και παρασκευάζονταν ο διχασμός της κοιλιακής αορτής, η 7η οσφυϊκή αρτηρία αμφοτερόπλευρα, η δεξιά έξω λαγόνιος αρτηρία, η έσω λαγόνιος αρτηρία αμφοτερόπλευρα, η μέση ιερά αρτηρία, στην οποία τοποθετούνταν ενδαρτηριακός καθετήρας για τη διενέργεια των αγγειογραφιών, η κοινή, η επιπολής και η εν τω βάθει μηριαία αρτηρία, όλοι οι κλάδοι της επιπολής μηριαίας αρτηρίας μέχρι του σημείου της μετάπτωσής της στην ιγνυακή αρτηρία καθώς και η σαφηνής αρτηρία του δεξιού σκέλους. Η παρασκευή όλων αυτών των αρτηριακών κλάδων θεωρήθηκε αναγκαία λόγω της ιδιαιτερότητας την οποία εμφανίζει η ανατομική του σκύλου, σύμφωνα με την οποία η έκφυση της έξω και της έσω λαγονίου αρτηρίας είναι ανεξάρτητη. Ουσιαστικά δηλαδή η κοιλιακή αορτή τριχάζεται στις δύο έξω λαγονίες αρτηρίες και στην μέση ιερά αρτηρία, η οποία στη συνέχεια επίσης τριχάζεται στις δύο έσω λαγονίες αρτηρίες και στην ουραία αρτηρία (Σχήμα 1). Από τις αρτηρίες αυτές, όπως αποδείχθηκε και από τις αγγειογραφίες που έγιναν στα προκαταρκτικά πειράματα, σχηματίζεται παράπλευρο δίκτυο που αφορά στους κλάδους της 7ης οσφυϊκής αρτηρίας, της έσω λαγονίου αρτηρίας, της ουραίας αρτηρίας και της επιπολής και της εν τω βάθει μηριαίας αρτηρίας. Για το λόγο αυτό από τις αρτηρίες που είχαν παρασκευασθεί απολιπώνονταν η 7η οσφυϊκή, η έσω λαγόνιος αμφοτερόπλευρα, η μέση ιερά περιφερικότερα του σημείου τοποθέτησης του καθετήρα της αγγειογραφίας, η εν τω βάθει μηριαία και όλοι οι κλάδοι της επιπολής μηριαίας προκειμένου ο αποκλεισμός της παράπλευρης κυκλοφορίας να είναι πλήρης όπως και η οξεία ισχαιμία. Στη συνέχεια περιδένονταν η κοινή μηριαία αρτηρία (Εικόνα 1) με σκοπό την διακοπή της κυκλοφορίας και την πρόκληση οξείας ισχαιμίας. Αρτηριογραφίες εκτελούνταν πριν από την ισχαιμία, αμέσως μετά την έναρξη της ισχαιμίας και αμέσως μετά την αποκατάσταση της κυκλοφορίας (Εικόνες 2,3,4). Τέλος στο αριστερό οπίσθιο σκέλος παρασκευάζονταν η επιπολής μηριαία φλέβα και οι μύες της γαστροκνημίας για την λήψη των δειγμάτων αίματος και

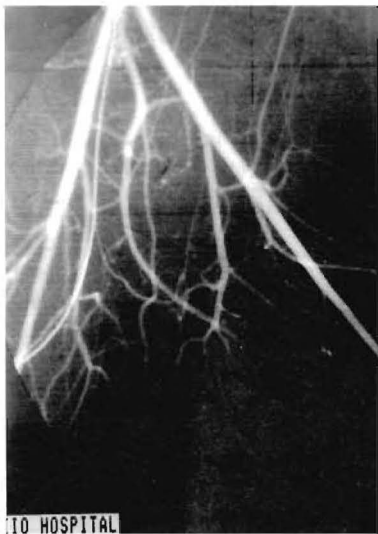


- A. Κοιλιακή Αορτή
- B. Τη Οσφυϊκή Αρτηρία
- Γ. Έξω Λαγόνιος Αρτηρία
- Δ. Έσω Λαγόνιος Αρτηρία
- Ε. Μέση Ιερά Αρτηρία
- Ζ. Ουραία Αρτηρία
- Η. Κοινή Μηριαία Αρτηρία
- Θ. Εν τω Βάθει Μηριαία Αρτηρία
- Ι. Επιπολής Μηριαία Αρτηρία
- ΙΑ. Κλάδοι Επιπολής Μηριαίας Αρτηρίας
- ΙΒ. Διχασμός Ιγνυακής Αρτηρίας
- ΙΓ. Καψήρας Αγγειογραφίας



Σχήμα 1. Σχεδιάγραμμα των κλάδων που παρασκευάζονται από το ύψος της κοιλιακής αορτής μέχρι την ιγνυακή αρτηρία και αυτών που θα απολινωθούν.

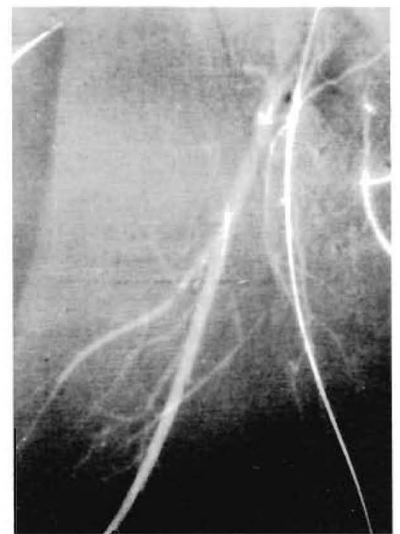
Εικ. 1. Περιβρογχισμός της κοινής μηριαίας αρτηρίας του δεξιού οπισθίου σκέλους για την πρόκληση οξείας ισχαιμίας.



Εικ. 2. Ενδαρτηριακή ψηφιακή αγγειογραφία οπισθίων σκελών πριν από την πρόκληση της οξείας ισχαιμίας.



Εικ. 3. Ενδαρτηριακή ψηφιακή αγγειογραφία του δεξιού οπισθίου σκέλους κατά την ισχαιμία.



Εικ. 4. Ενδαρτηριακή ψηφιακή αγγειογραφία του δεξιού οπισθίου σκέλους κατά την επαναιμάτωση.

των μυϊκών βιοψιών. Στη συνέχεια λαμβάνονταν δείγματα αίματος και βιοψίες από τους μύες της γαστροκνημίας του υγιούς σκέλους (μάρτυρας) και του πάσχοντος σκέλους πριν από την ισχαιμία, 6 και 12 ώρες μετά την πρόκληση της ισχαιμίας και 6 και 12 ώρες μετά την αποκατάσταση της κυκλοφορίας για τον προσδιορισμό της GOT, της GPT και της CPK. Οι βιοψίες των μυών αμέσως μετά την λήψη τους τοποθετούνταν σε υγρό

άζωτο για την διακοπή κάθε μεταβολικής δραστηριότητας και στη συνέχεια σε βαθιά κατάψυξη (-70 °C). Ακολουθούσε ομογενοποίηση και ειδική επεξεργασία των μυϊκών δειγμάτων για να είναι δυνατός ο προσδιορισμός των ενδομυϊκών συγκεντρώσεων των ελεγχόμενων παραμέτρων. Στη συνέχεια τα επεξεργασμένα δείγματα αίματος και μυών φυγοκεντρούνταν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στις 3000/min για 15 λεπτά. Στο υπερκείμενο υγρό

που λαμβάνονταν μετά την φυγοκέντρηση μπορούσαν να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά οι παραπάνω παράμετροι<sup>1-10</sup>.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε για την εκτίμηση της ισχαιμικής βλάβης και τη δυνατότητα αποκατάστασής της μετά την επαναιμάτωση. Χρησιμοποιήθηκε το t-test για ζεύγη τιμών.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΙΚΗ ΟΞΑΛΟΞΙΚΗ ΤΡΑΝΣΑΜΙΝΑΣΗ

#### A. Μεταβολές της GOT στον ορό.

*Υγιές σκέλος - μάρτυρας.* Η μέση τιμή της στην συστηματική κυκλοφορία πριν από την ισχαιμία ήταν 27,58 U/L. Μετά από 6 ώρες ισχαιμίας αυξήθηκε στις 31,32 U/L (13,6%) και μετά από 12 ώρες στις 33,2 U/L (20,4%). Κατά την επαναιμάτωση συνέχισε να είναι αυξημένη. Στις 6 ώρες ήταν 33,35 U/L (20,92%) και στις 12 ώρες 40,1 U/L (45,4%) (Πίνακας 1). Οι τιμές μετά την ισχαιμία δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά συγκρινόμενες με τις τιμές πριν από την ισχαιμία ( $p=0,05$ ).

*Πάσχον σκέλος.* Η μέση τιμή της GOT παρουσίασε προοδευτική αύξηση τόσο κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, όσο και μετά την επαναιμάτωση. Η αύξηση αυτή κυμάνθηκε στα όρια της σημαντικότητας ( $p<0,05$ ). Πριν από την ισχαιμία ήταν 21,2 U/L. Αυξήθηκε κατά 26% (26,72U/L) στις 6 ώρες ισχαιμίας, κατά 31,8% (27,95U/L) στις 12 ώρες ισχαιμίας, κατά 79,8% (38,12U/L) στις 6 ώρες μετά την αποκατάσταση της κυκλοφορίας και κατά 107,4% (43,96 U/L) στις 12 ώρες (Πίνακας 1).

#### A1. Μεταβολές της GOT στον ενδοκυττάριο χώρο του σκελετικού μυϊκού ιστού.

*Υγιές σκέλος - μάρτυρας.* Η διακύμανση της μέσης τιμής της GOT στον ενδοκυττάριο χώρο του υγιούς μυϊκού ιστού στατιστικά δεν ήταν σημαντική ( $p>0,05$ ). Πριν από την ισχαιμία ήταν 28,16 U/L. Αυξήθηκε στις 31,37 U/L (11,4%) στις 6 ώρες ισχαιμίας και στις 30,19 U/L (7,2%) στις 12 ώρες ισχαιμίας. Μετά την αποκατάσταση της κυκλοφορίας, η μέση τιμή της GOT ήταν στις 6 ώρες 28,85U/L (αύξηση 2,45%) και στις 12 ώρες 33,02U/L (αύξηση 17,26%) (Πίνακας 2).

*Πάσχον σκέλος.* Η μέση τιμή της GOT στον ενδοκυττάριο χώρο του πάσχοντα μυϊκού ιστού πριν από την έναρξη της ισχαιμίας ήταν 28,97 U/L. Στις 6 ώρες ισχαιμίας αυξήθηκε σε 40,9 U/L (41,52%) και στις 12 ώρες σε 40,54 U/L (40,27%).

Μετά την αποκατάσταση της κυκλοφορίας αν και παρουσίασε πτώση παρέμεινε σε επίπεδα υψηλότερα από αυτό της αρχικής τιμής. Έτσι στις 6 ώρες επαναιμάτωσης η μέση τιμή ήταν 34,54 U/L (αύξηση 19,22%) και στις 12 ώρες 36,2 U/L (αύξηση 24,95%). Η διακύμανση αυτή της μέσης τιμής της GOT δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Πίνακας 2).

### ΓΛΟΥΤΑΜΙΝΙΚΗ ΠΥΡΟΣΤΑΦΥΛΙΚΗ ΤΡΑΝΣΑΜΙΝΑΣΗ

#### B. Μεταβολές της GPT στον ορό.

*Υγιές σκέλος - μάρτυρας.* Η διακύμανση της μέσης τιμής της GPT στην συστηματική κυκλοφορία δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $p>0,05$ ). Πριν από την ισχαιμία η μέση τιμή ήταν 28,14 U/L. Στις 6 ώρες ισχαιμίας μειώθηκε σε 27,01 U/L (4,02%) και στις 12 ώρες αυξήθηκε σε 29 U/L (3,06%). Μετά την αποκατάσταση της κυκλοφορίας, στις 6 ώρες μειώθηκε σε 24,84 U/L (11,73%), ενώ στις 12 ώρες αυξήθηκε σε 38,94 U/L (38,38%) (Πίνακας 3).

*Πάσχον σκέλος.* Η μέση τιμή της GPT στο φλεβικό αίμα του πάσχοντος σκέλους πριν από την έναρξη της ισχαιμίας ήταν 27,25 U/L. Στις 6 ώρες ισχαιμίας αυξήθηκε σε 34,51 U/L (26,64%) και στις 12 ώρες σε 33,1 U/L (21,47%). Μετά την αποκατάσταση της κυκλοφορίας η μέση τιμή της GPT συνέχισε να είναι αυξημένη σε χαμηλότερα όμως επίπεδα από αυτά της ισχαιμίας. Στις 6 ώρες επαναιμάτωσης ήταν 30,61 U/L (12,33%) και στις 12 ώρες 32,42 U/L (18,978%). Η διακύμανση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Πίνακας 3).

#### B1. Μεταβολές της GPT στον ενδοκυττάριο χώρο του σκελετικού μυϊκού ιστού.

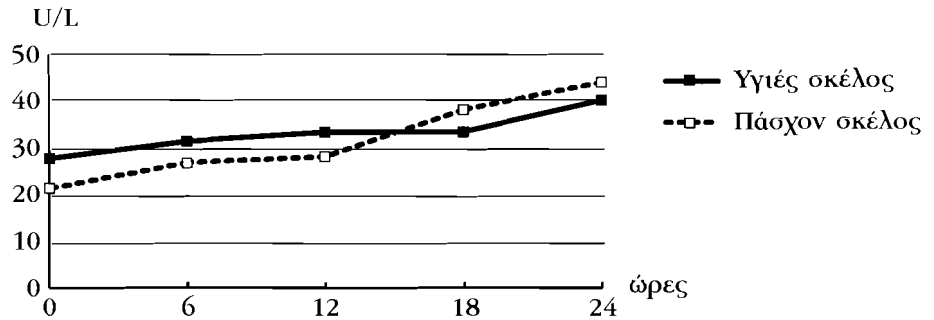
*Υγιές σκέλος - μάρτυρας.* Η μέση τιμή της GPT στον ενδοκυττάριο χώρο του υγιούς μυϊκού ιστού παρουσίασε προοδευτική αύξηση. Η μέση τιμή των 28,66 U/L πριν από την ισχαιμία, αυξήθηκε στις 35,8 U/L (24,91%) στις 6 ώρες ισχαιμίας, στις 38,16 U/L (33,15%) στις 12 ώρες ισχαιμίας, στις 38,73 U/L (35,13%) στις 6 ώρες μετά την αποκατάσταση της κυκλοφορίας και στις 42,93 U/L (49,8%) στις 12 ώρες επαναιμάτωσης (Πίνακας 4).

*Πάσχον σκέλος.* Η μέση τιμή της GPT στον ενδοκυττάριο χώρο του πάσχοντα μυϊκού ιστού πριν από την ισχαιμία ήταν 37,9 U/L. Στις 6 ώρες ισχαιμίας αυξήθηκε σε 48,39 U/L (27,68%) και στις 12 ώρες σε 55,73 U/L (47%). Κατά την επαναιμάτωση παρέμεινε αυξημένη με ενδείξεις προσέγγισης προς την αρχική μέση τιμή. Στις 6 ώρες

**Πίνακας 1. Μεταβολές της μέσης τιμής GOT στον ορό πριν και μετά την ισχαιμία και μετά την επαναϊμάτωση**

Ωρες/Ομάδες	0	6	12	18	24
Υγιές σκέλος	27,58±16,9	31,32±18,69	33,20±18,79	33,35±13,56	40,1±17,1
Πάσχον σκέλος	21,20±6,75	26,72±7,3	27,95±10,15	38,12±5,96	43,96±22,75

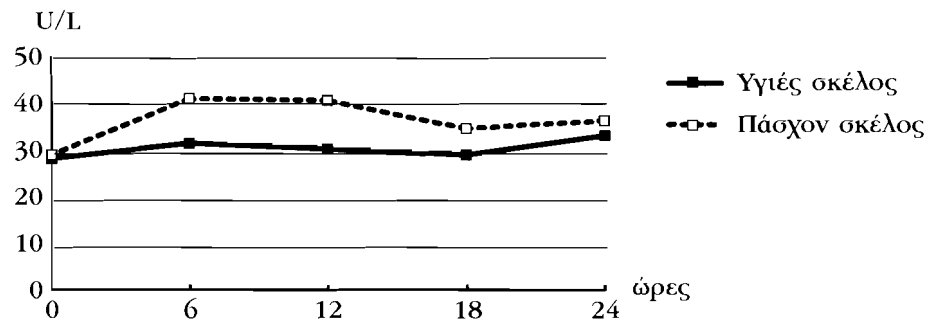
ρ υγιές = 0,005  
ρ πάσχον < 0,005



**Πίνακας 2. Μεταβολές της μέσης τιμής GOT στον ενδοκυττάριο χώρο του μυϊκού ιστού**

Ωρες/Ομάδες	0	6	12	18	24
Υγιές σκέλος	28,16±16,19	31,37±20,2	30,19±17,26	28,85±15,99	33,02±22,7
Πάσχον σκέλος	28,97±17,23	40,90±26,34	40,54±23,44	34,54±22,1	36,2±21,79

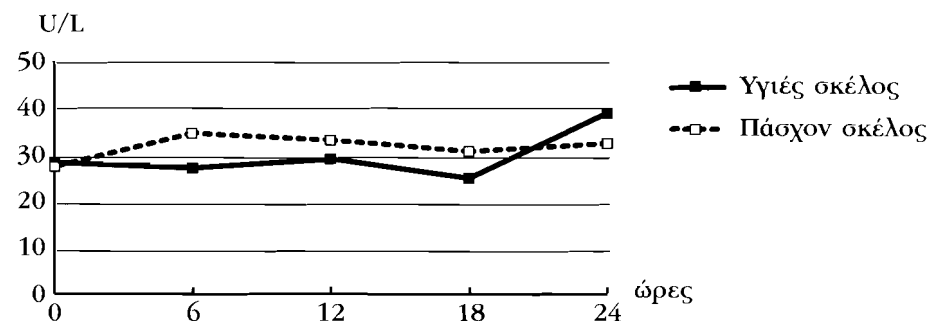
ρ >0,005



**Πίνακας 3. Μεταβολές της μέσης τιμής GPT στον ορό**

Ωρες/Ομάδες	0	6	12	18	24
Υγιές σκέλος	28,14±28,14	27,01±27,65	29,00±19,35	24,84±14,21	38,94±30,51
Πάσχον σκέλος	27,25±35,25	34,51±29,73	33,10±21,01	30,61±16,4	32,42±15,2

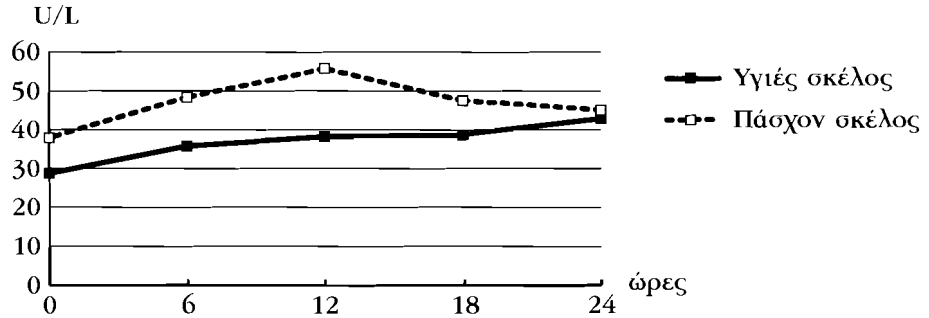
ρ >0,005



Πίνακας 4. Μεταβολές της μέσης τιμής GPT στον ενδοκυττάριο χώρο του μυϊκού ιστού

Ωρες/Ομάδες	0	6	12	18	24
Υγιές σκέλος	28,66±12,58	35,80±22,8	38,16±21,15	38,73±20,24	42,93±28,15
Πάσχον σκέλος	37,9±15,39	48,39±24,68	55,73±28,51	47,56±23,64	45,13±23,7

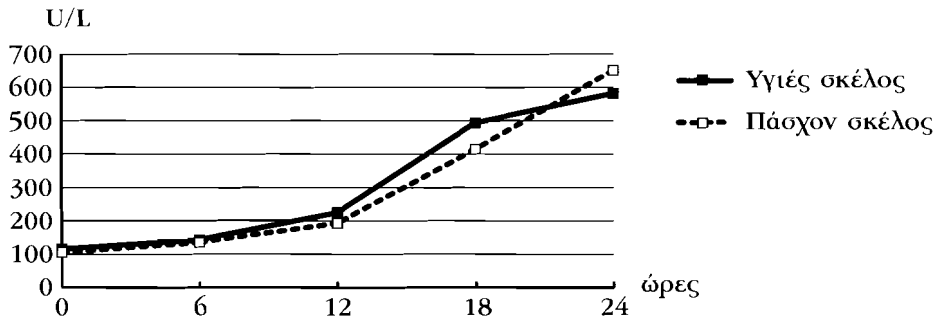
p&gt;0,005



Πίνακας 5. Μεταβολές της μέσης τιμής CPK στον ορό

Ωρες/Ομάδες	0	6	12	18	24
Υγιές σκέλος	115,60±84,6	143,60±75,7	224,77±242,1	494,11±920,2	582,15±114,9
Πάσχον σκέλος	105,29±89,56	135,82±103,5	192,97±176,6	414,65±684,3	651,70±131,2

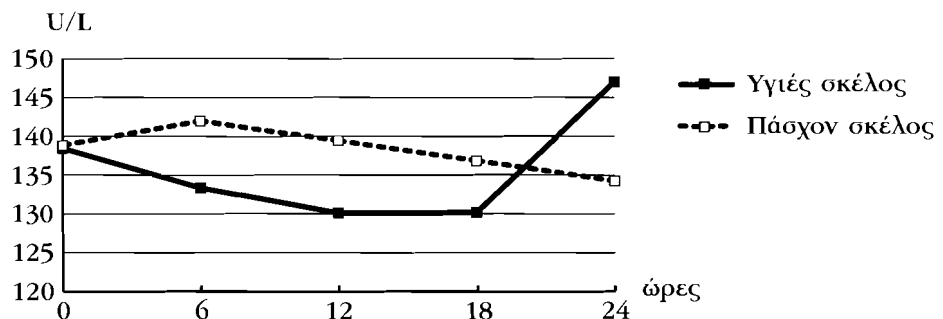
p&lt;0,005



Πίνακας 6. Μεταβολές της μέσης τιμής CPK στον ενδοκυττάριο χώρο του μυϊκού ιστού

Ωρες/Ομάδες	0	6	12	18	24
Υγιές σκέλος	138,42±71,9	133,35±78,4	130,1±69,36	130,16±71,72	147,01±107,7
Πάσχον σκέλος	138,81±75,86	142,00±66,28	139,44±65,7	136,88±71,8	134,26±59,82

p&gt;0,005



της επαναιμάτωσης η μέση τιμή της GPT ήταν 47,56 U/L (αύξηση 25,49%) και στις 12 ώρες 45,13 U/L (αύξηση 19,07%) (Πίνακας 4). Η διακύμανση της μέσης τιμής της GPT και στις δύο ομάδες δεν ήταν σημαντική ( $p = 0,05$ ).

#### ΚΡΕΑΤΙΝΟΦΩΣΦΟΚΙΝΑΣΗ

##### Γ. Μεταβολές της CPK στον ορό.

*Υγιές σκέλος - μάρτυρας.* Η μέση τιμή της CPK στην συστηματική κυκλοφορία πριν από την ισχαιμία ήταν 115,6 U/L. Στις 6 ώρες ισχαιμίας αυξήθηκε στις 143,6 U/L (24,223%) και στις 12 ώρες σε 224,77 U/L (94,43%). Κατά την επαναιμάτωση συνέχισε να αυξάνεται. Στις 6 ώρες επαναιμάτωσης αυξήθηκε στις 494,11 U/L (327,43%) και στις 12 ώρες στις 582,15 U/L (403,56%) (Πίνακας 5).

*Πάσχον σκέλος.* Η μέση τιμή της CPK στο φλεβικό αίμα του πάσχοντος σκέλους πριν από την ισχαιμία ήταν 105,29 U/L. Στις 6 ώρες ισχαιμίας αυξήθηκε σε 135,82 U/L (29%) και στις 12 ώρες στις 192,97 U/L (83,27%). Κατά την επαναιμάτωση συνέχισε να αυξάνεται. Στις 6 ώρες αυξήθηκε σε 414,65 U/L (293,87%) και στις 12 ώρες στις 651,7 U/L (518,95%) (Πίνακας 5). Η διακύμανση της μέσης τιμής της CPK ήταν στατιστικά σημαντική και στις δύο ομάδες ( $p < 0,05$ ).

##### Γ1. Μεταβολές της CPK στον ενδοκυττάριο χώρο του σκελετικού μυϊκού ιστού.

*Υγιές σκέλος - μάρτυρας.* Η μέση τιμή της CPK δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διακύμανση σε όλη τη διάρκεια του πειράματος ( $p > 0,05$ ). Η μέση τιμή της πριν από την ισχαιμία ήταν 138,42 U/L. Ελαττώθηκε στις 133,35 U/L (3,7%) στις 6 ώρες ισχαιμίας, στις 130,1 U/L (6%) στις 12 ώρες ισχαιμίας και στις 130,16 U/L (6%) στις 6 ώρες μετά την αποκατάσταση της κυκλοφορίας. Στις 12 ώρες επαναιμάτωσης αυξήθηκε στις 147,01 U/L (6,2%) (Πίνακας 6).

*Πάσχον σκέλος.* Η διακύμανση της μέσης τιμής της CPK ήταν ασήμαντη σε όλες τις φάσεις του πειράματος ( $p > 0,05$ ). Η μέση τιμή των 138,81 U/L πριν από την ισχαιμία αυξήθηκε στις 142 U/L (2,3%) στις 6 ώρες ισχαιμίας και στις 139,44 U/L (0,45%) στις 12 ώρες ισχαιμίας, ενώ ελαττώθηκε κατά την επαναιμάτωση στις 136,88 U/L (1,4%) στις 6 ώρες και στις 134,26 U/L (3,3%) στις 12 ώρες (Πίνακας 6).

#### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στους αερόβιους οργανισμούς η οξεία ισχαιμία ενός ιστού οδηγεί στην ενεργοποίηση του αναερόβιου μεταβολισμού προκειμένου να αντι-

μετωπισθούν οι συνθήκες ένδειας οξυγόνου και ενεργειακών στοιχείων και να είναι δυνατή η επιβίωσή του. Όμως ο αναερόβιος μεταβολισμός μπορεί να ανταποκριθεί στις απαιτήσεις των ιστών σε ενέργεια για περιορισμένο χρόνο. Ως εκ τούτου η αποκατάσταση της κυκλοφορίας του αίματος είναι απαραίτητη προκειμένου να αποφευχθεί η νέκρωση και να απομακρυνθούν τα τοξικά προϊόντα. Αλλά συχνά στην επαναιμάτωση παρατηρείται επιδείνωση των ιστικών βλαβών. Η επιδείνωση αυτή όπως και η δυνατότητα αποκατάστασης των ισχαιμικών βλαβών στην περίοδο της επαναιμάτωσης εξαρτώνται από το είδος του ιστού, από τον χρόνο και από τον βαθμό της ισχαιμίας. Ο μυϊκός ιστός και συγκεκριμένα οι σκελετικοί μύες είναι από τους πλέον ανθιστάμενους ιστούς στην οξεία ισχαιμία / επαναιμάτωση. Η διαφορετική αντίσταση των ιστών στην οξεία ισχαιμία / επαναιμάτωση φαίνεται ότι οφείλεται στην διαφορά της συγκέντρωσης ενζυμικών συστημάτων, μεσολαβητών και υποστρωμάτων που μετέχουν στις βιοχημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα<sup>11-16</sup>.

Οι τρανσαμινάσες (GOT και GPT) είναι τα ένζυμα που διαδραματίζουν ιδιαίτερο ρόλο στον μεταβολισμό των αμινοξέων κατά τη διάρκεια της οξείας ισχαιμίας και παρέχουν στοιχεία για την αναερόβια γλυκόλυση. Στις περιπτώσεις οξείας ισχαιμίας παρατηρείται αύξηση των τιμών τους ανάλογη του χρόνου και του βαθμού ισχαιμίας και του είδους του ισχαιμούντος ιστού. Μετά την επαναιμάτωση σε ήπιες μορφές οξείας μυϊκής ισχαιμίας επανέρχονται στα φυσιολογικά επίπεδα εντός ολίγων ημερών. Μη αναστρέψιμες νεκρωτικές βλάβες του μυϊκού ιστού συνοδεύονται από σταθερά υψηλά επίπεδα τρανσαμινασών<sup>19-22</sup>.

Στην μελέτη μας παρατηρήθηκε στατιστικά μη σημαντική αύξηση της μέσης τιμής της GOT στην συστηματική κυκλοφορία και στο φλεβικό αίμα του πάσχοντος σκέλους τόσο στην ισχαιμία όσο και στην επαναιμάτωση. Στον ενδοκυττάριο χώρο του υγιούς μυϊκού ιστού η διακύμανσή της ήταν σχεδόν μηδενική ενώ στον ενδοκυττάριο χώρο του μυϊκού ιστού του πάσχοντος σκέλους αυξήθηκε στατιστικά μη σημαντικά κατά την ισχαιμία με τάση επανόδου στις αρχικές τιμές κατά την επαναιμάτωση. Η μέση τιμή της GPT στην συστηματική κυκλοφορία παρουσίασε στατιστικά μη σημαντική αύξηση 6 ώρες μετά από την έναρξη της επαναιμάτωσης, ενώ στο φλεβικό αίμα του πάσχοντος σκέλους αυξήθηκε στατιστικά μη σημαντικά στην φάση της ισχαιμίας με επάνοδο προς τις αρχικές τιμές κατά την επαναιμάτωση. Στον

ενδοκυττάριο χώρο του υγιούς μυϊκού ιστού παρατηρήθηκε στατιστικά μη σημαντική αύξηση σε όλη την διάρκεια του πειράματος, ενώ στον ενδοκυττάριο χώρο του πάσχοντος μυϊκού ιστού αυξήθηκε στατιστικά μη σημαντικά κατά την ισχαιμία με προοδευτική πτώση στην επαναιμάτωση.

Η CPK είναι το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση PCr  $\leftrightarrow$  ATP, και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στον μεταβολισμό των γραμμωτών μυών σε συνθήκες ένδειας οξυγόνου. Κατά τη διάρκεια της οξείας ισχαιμίας παρατηρείται αύξηση της τιμής της τόσο στην συστηματική κυκλοφορία όσο και στο φλεβικό αίμα της περιοχής που ισχαιμεί. Κατά την επαναιμάτωση η αύξησή της φθάνει σε ακόμη υψηλότερα επίπεδα, ανάλογα με το βαθμό βλάβης των ραβδωτών μυών. Σε ήπιες περιπτώσεις τα επίπεδα της CPK είναι δυνατόν να ελαττωθούν σε λίγες ώρες ή σε μια έως δυο ημέρες μετά την επαναιμάτωση. Σε μετρίως σοβαρές καταστάσεις ισχαιμίας μπορεί να συνεχίσει να αυξάνεται για μερικές ημέρες μετά την επαναιμάτωση και στη συνέχεια να ελαττωθεί προοδευτικά, φθάνοντας σε φυσιολογικά επίπεδα μετά από 10 - 12 ημέρες. Τέλος, σε πολύ σοβαρές καταστάσεις ισχαιμίας, μπορεί να ξεπεράσει τις 20000 μονάδες χωρίς καμία ένδειξη μείωσης<sup>6, 21, 23-31</sup>.

Στην μελέτη μας η διακύμανση της μέσης τιμής της CPK στην συστηματική κυκλοφορία και στο φλεβικό αίμα του πάσχοντος σκέλους ήταν στατιστικά σημαντική παρουσιάζοντας συνεχή προοδευτική αύξηση σ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Στον ενδοκυττάριο χώρο του υγιούς και του πάσχοντος μυϊκού ιστού οι αποκλίσεις από την αρχική μέση τιμή δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Μεταβολές των ενζύμων GOT, GPT, CPK στην συστηματική κυκλοφορία παρατηρούνται και από την επίδραση των τοξικών προϊόντων της οξείας ισχαιμίας και της επαναιμάτωσης των σκελετικών μυών σε άλλα όργανα στόχους όπως το ήπαρ, τα νεφρά, οι πνεύμονες, και η καρδιά<sup>19, 22, 28, 30, 32</sup>. Ως εκ τούτου η ερμηνεία των μεταβολών τους στην συστηματική κυκλοφορία πρέπει να είναι πολύ προσεκτική.

Τελικά από την ανάλυση των αποτελεσμάτων μας προκύπτει ότι:

- Οι μεταβολές της GOT και της GPT στην κυκλοφορία και στον ενδοκυττάριο χώρο του μυϊκού ιστού του υγιούς και του πάσχοντος σκέλους δεν εκφράζουν τον βαθμό της ισχαιμικής βλάβης, ούτε τα αποτελέσματα της επαναιμάτωσης.

- Οι μεταβολές της CPK στη συστηματική κυκλοφορία και στο φλεβικό αίμα του πάσχοντος σκέλους μπορούν επιλεκτικά να χρησιμοποιηθούν στην εκτίμηση του βαθμού της ισχαιμικής βλάβης.

- Οι μεταβολές της CPK στον ενδοκυττάριο χώρο του μυϊκού ιστού του υγιούς και του πάσχοντος σκέλους δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην εκτίμηση του βαθμού της ισχαιμικής βλάβης και των αποτελεσμάτων της επαναιμάτωσης.

## ABSTRACT

*Kambaroudis Ap, Gerassimidis Th, Karamanos D, Passinis Ch, Sakadamis Ath. Enzyme alterations during the period of acute ischemia and reperfusion of muscle tissue (experimental study). Hippokratia 2001, 5 (1): 13-22*

The purpose of this study was: a) the evaluation of the changes of the values of GOT (glutamine-transaminase), GPT (glutamine-pyruvate transaminase) and CPK (creatinine - phosphokinase), during a 12-hour period of acute muscle tissue ischemia and corresponding time of reperfusion, and b) the investigation of utilizing these changes and the evaluation of the degree of ischemic lesions and the restoration of them after reperfusion.

Methods - Material: In the right posterior limb of 15 non thorough- canines we provoked acute ischemia lasting for 12 hours that was followed by reperfusion of the corresponding time by removing the cause of obstruction. Before the introduction of ischemia, 6 hours after it, 12 hours after it, 6 hours after reperfusion and 12 hours after reperfusion we obtained blood samples from systemic circulation (healthy limb was used as reference values) and from the venous circulation of the suffering limb and samples from muscle tissue from the healthy limb that was used as reference value and from the suffering limb for the evaluation of GOT, GPT and CPK.

Results: GOT and GPT in systemic circulation and in the intracellular space of the healthy muscle tissue did not show considerable changes. In venous blood and in the intracellular space of the suffering limb during the period of acute ischemia we observed a statistically non-important increase of GOT and GPT which was observed



during reperfusion as well. CPK in systemic circulation in venous blood of the suffering limb and in suffering muscle tissue was increased considerably during ischemia and remained increased during reperfusion.

Conclusion: The changes of GOT and GPT in systemic circulation and in the intracellular space of healthy muscle tissue and in the suffering limb did not correlate to the degree of ischemic changes nor to the changes after reperfusion. The changes in CPK in systemic circulation and in venous blood of the suffering limb can be used selectively for the evaluation of the ischemic lesion. The change in CPK in the intracellular space of the muscle tissue of the suffering limb cannot be used for the evaluation of the degree of the ischemic lesion.

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Καρπαρούδης Α. Ισχαιμικές αλλοιώσεις των κάτω άκρων μετά από οξεία ισχαιμία και επαναμιάτωση. Διδακτορική διατριβή, Ιατρικό Τμήμα Α.Π.Θ. 1997
2. Stryer L. Βιοχημεία. Ηράκλειο 1995: 330 - 345
3. Γκελερής Π. Εργοφυσιολογία. Θεσσαλονίκη 1990: 29-69 και 173 - 289
4. Haljamae H, Enger E. Human skeletal muscle energy metabolism during and after complete tourniquet ischemia. *Ann Surg* 1975, 182:9 - 16
5. Fitch CD, Shields RP. Creatine metabolism in skeletal muscle. *J Bio Chem* 1966, 241: 3611 -3615
6. Farber JF. Biochemical changes during ischemia and reperfusion in rat liver. *Lab Invest* 1982, 47:114 -123
7. Eklof B, Neglen P, Thomson D. Temporary incomplete ischemia of the legs caused by aortic clamping in man. *Ann Surg* 1981, 193: 99 - 104
8. Beylrsdorf F, Matheli G, Kruger S, et al. Avoiding reperfusion injury after limb revascularization: Experimental observations and recommendations for clinical application. *J Vasc Surg* 1989, 9: 757 - 766
9. Sarvary E, Halsey J, Conger KA, Garcia JH, Kovach AG. ATP and pH predictors of histologic damage following global cerebral ischemia in the rat. *Acta Physiol. Hung.* 1994, 82: 109 - 124
10. Andersson J, Eklof B, Neglen P, Thomson D. Metabolic changes in blood and skeletal muscle in reconstructive aortic surgery. *Ann Surg* 1979, 189: 283 - 289
11. Τσιμογιάννης ΕΚ, Τσιμογιάννης ΙΚ. Η παθογένεια της ισχαιμίας των ιστών. *Ιατρική* 1989, 55: 566 - 574
12. Zimmerman BI, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin N Am* 1992, 72: 65 - 83
13. Hayes PG, Liauw S, Smith A, Romaschin AD, Walker PM. Exogenous magnesium chloride- adenosine triphosphate administration during reperfusion reduces the extent of necrosis in previously ischemic skeletal muscle. *J Vasc Surg* 1990, 11: 441 - 447
14. Singh AK, Gulati S. Effect of ischemia - reperfusion injury on the morphology of peroxisomes. *Mol Cell Biochem* 1995, 144: 19 - 26
15. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 1998, 179: 169 - 187
16. Tuncel N, Erden S, Uzuner K, Altiocka G, Tuncel M. Ischemic - reperfused rat skeletal muscle: the effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on contractile force, oxygenation and antioxidant enzyme systems. *Peptides*. 1997, 18: 269 - 275
17. Crinnion JL, Homer - Vanniasinkam S, Parkin SM, Gough MJ. Role of neutrophil - endothelial adhesion in skeletal muscle reperfusion injury. *Br J Surg* 1996, 83: 231 -234
18. Liedtke AJ, Lynch ML. Alteration of gene expression for glycolytic enzymes in aerobic and ischemic myocardium. *Am J Physiol*. 1999, 277: 435 - 440
19. Stock W, Isselhard W. Post - ischemic hyperemia and metabolic changes after long - lasting blood flow interruption of a dog extremity. *Vasc Surg* 1972, 6: 255 - 262
20. Dunant J, Nosbaum J, Waibel P. Metabolic changes during induced ischemia of the leg. *J Cardiovasc Surg*. 1973, 14: 586 - 591
21. Rapaport E. Serum enzymes and isoenzymes in the diagnosis of acute myocardial infraction. Part II: 150 - enzymes. *Mod Concepts Cardiovasc Dis* 1977, 46: 47 - 58
22. Ozala M, Nakamura M, Teraoka S, Ota K. Ebselen, a novel anti - oxidant compound, protects the rat liver from ischemia - reperfusion injury *Transpl Int* 1997, 10: 96- 102
23. Dixon JS, Fuchs SC, Ebert PA. Changes in serum creatine phosphokinase activity following thoracic, cardiac and abdominal operations. *Arch Surg* 1971, 103: 66 - 71
24. Russell SM, Bleiweiss S, Brownlow K. Ischemic rhabdomyolysis and creatine phosphokinase isoenzymes. *JAMA* 1976, 225: 632 - 9
25. Ferrari R, Cargnoni A, Bernocchi P, et al. Effects of felopidine on the ischemic heart: insight into the mechanism of cytoprotection. *Cardiovasc Drugs Ther* 1996, 10: 425 - 437
26. Garre L, Alvarez A, Rubio M, et al. Use of cardiac troponin T rapid assay in the diagnosis of a myocardial injury secondary to electrical cardioversion. *Clin Cardiol* 1997, 20: 19 - 21
27. Sun JS, Hang YS, Huang IH, Lu FJ. A simple chemiluminescence assay for detecting oxidative stress in ischemic limb injury. *Free Radic Biol Med* 1996, 20: 107 - 112
28. Obadia JF, Ben Baouali A, Maupoil V, Rochette I. A study of the 30 minutes following reperfusion after crystalloid and cold blood cardioplegia by enzymatic and metabolic analysis of coronary blood flow. *Ann Chir* 1996, 50: 390 - 396
29. Asami A, Oru M, Shirasugi N, Yamazaki M, Akiyama Y, Kitajima M. The effect of allopurinol on interstitial purine metabolism and tissue damage in skeletal muscle I - R injury. *J Cardiovasc Surg* 1996, 37: 209 - 216
30. Du XL, Lan HJ, Sun ZQ. Effects of warm blood cardioplegic solution on myocardial protection. *J Tongji Med Univ*. 1995, 15: 212 - 216
31. Sun JS, Tsuang YH, Lu FJ, Hang YS. Biochemical and histopathological changes in the mortality caused by acute

