

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

IMPACT DE LA PRÉSERVATION À FROID ET DU RÉCHAUFFEMENT

SUR LES MÉCANISMES DE RÉGULATION DU VOLUME CELLULAIRE,

LE SYSTÈME DE TRANSPORT DES ACIDES AMINÉS ET

LES CAPACITÉS MÉTABOLIQUES OXIDATIVES HÉPATIQUES

par

Halima Serrar

département de pharmacologie

faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

philosophia doctor (Ph. D.)

1999



W
4
U58
1999
V.075

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

IMPACT DE LA PRÉSERVATION À FROID ET DU RÉCHAUFFEMENT
SUR LES MÉCANISMES DE RÉGULATION DU VOLUME CELLULAIRE
LE SYSTÈME DE TRANSPORT DES ACIDES ANNÉS ET
LES CAPACITÉS MÉTABOLIQUES OXYNATIVES HÉPATIQUES

par

Filipe Serrão

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

philosophie (niveau M. Sc.)

1999



UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

***IMPACT DE LA PRÉSERVATION À FROID ET DU RÉCHAUFFEMENT
SUR LES MÉCANISMES DE RÉGULATION DU VOLUME CELLULAIRE,
LE SYSTÈME DE TRANSPORT DES ACIDES AMINÉS ET
LES CAPACITÉS MÉTABOLIQUES OXIDATIVES***

Présentée par

Halima Serrar

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Gabriel Plaa, Ph. D.président-rapporteur

Pierre Haddad, Ph. D.directeur

Michel Charbonneau, Ph. D.examineur externe

Ibrahim Youssef, Ph. D.membre du jury

Acceptée le : 99-04-01

“Le foie est un carrefour où se mêlent toutes les grandes voies métaboliques de synthèse, de transformation, de stockage et de catabolismes. Tous ces mécanismes chimiques sont sous la dépendance d’enzymes, de transporteurs, et de récepteurs représentant plusieurs milliers de protéines.”

J. Sarles et F. Giraud

Donc l'équivalent du rein artificiel ou de pompe cardiaque prothétique extra ou intracorporelle apparaît comme objectif hors d'atteinte.

SOMMAIRE

L'échec de la transplantation est dû en partie aux dommages causés par la préservation à froid et la réperfusion à chaud lors de l'intervention. Parmi les hypothèses retenues pour expliquer ces dommages, on retient la formation des radicaux libres et les perturbations du pH, du calcium et du volume cellulaire. L'ajout de certaines substances dans le milieu de préservation a permis de prolonger de 6h à 24h la survie de l'organe. Malgré le développement de solutions de préservation qui diminuent le gonflement cellulaire des foies à transplanter, les dommages de la reperfusion chaude ne sont pas abolis. Il se peut donc, que l'hypothermie anoxique altère les mécanismes de régulation du volume cellulaire et que ces perturbations contribuent aux dommages observés lors de la reperfusion du greffon chez le receveur.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons vérifié dans le premier chapitre si les conditions de la préservation à froid suivie du réchauffement entravaient la diminution ou l'augmentation compensatrice de volume observé respectivement après un choc hypotonique (retrait de 50 mmol de NaCl). Notre étude démontre que les hépatocytes préservés dans la solution de l'Université de Wisconsin (U.W.) ont été moins résistants aux stress osmotiques, ce qui peut rendre les cellules moins aptes à répondre aux stimulations physiologiques comme l'accumulation des acides aminés, spécialement lors des demandes métaboliques et l'alimentation parentérale riche en acides aminés. Ceci devrait être confirmé dans les conditions *in vivo*. Cependant, nos résultats supportent la notion que la perturbation du volume cellulaire homéostatique peut correspondre au

dysfonctionnement primaire observé dans 15% des cas lors de la transplantation hépatique.

Subséquentement, nous avons étudié l'impact de la préservation et la réperfusion à chaud sur le transport hépatique d'acides aminés couplés au Na^+ (10 mM). Nous avons mesuré par la technique de vidéoplanimétrie les changements initiaux de volume qui reflètent l'accumulation des acides aminés. Nous avons constaté qu'en fonction du temps de préservation les transporteurs sont affectés différemment. Le gonflement induit par la proline, substrat spécifique du système ASC est très sensible à la préservation à froid dans la solution U.W. chutant de 50 % après 24h de préservation comparée avec le contrôle sans préservation, en opposition à la glutamine ou à l'analogue de l'alanine. Ceci nous a conduit à proposer que le gonflement induit par la proline représente un index fonctionnel sensible de l'intégrité des cellules du foie.

Dans le second chapitre, nous avons comparé l'efficacité de la solution U.W. et la solution Sodium-Lactobionate-Sucrose (SLS) dans leurs capacités à maintenir la viabilité cellulaire et une fonction différenciée des cellules du foie (gonflement induit par l'addition de 10 mM de Proline, substrat spécifique du système ASC).

Enfin, dans le troisième chapitre, nous avons comparé l'effet de ces deux solutions (U.W./SLS) sur le métabolisme des médicaments et l'activité catalytique du cytochrome P-450 au niveau des cellules isolées de foie de rat. Cette activité catalytique est calculée par la mesure de la concentration totale du cytochrome P-450 et des métabolites de la théophylline générés après 4h d'incubation. La théophylline est utilisée car

elle est métabolisée par plusieurs isoformes du cytochrome P-450 : cytochrome P-450 1A2, 2D6, 2E1 et 3A4 dont l'aboutissement est le 1,3-DMU qui est son métabolite majeur.

Nous avons noté que la majorité de perturbations observées dans notre modèle *in vitro* est entre 10 et 24 h de préservation à froid des hépatocytes dans les deux solutions (U.W./SLS). Ceci correspond à la période 12 h de préservation à froid des foies humains dans la solution U.W., qui représente un facteur de risque relatif pour un mauvais pronostic, responsable de dysfonctionnement primaire observé dans 15% des cas lors de la transplantation hépatique.

Nos données démontrent clairement que la préservation à froid des hépatocytes dans la solution SLS, préparée au laboratoire à coût très réduit, donne des résultats équivalents à ceux de la solution U.W. (commercialisée par Dupont) quant à sa capacité à maintenir la viabilité cellulaire, l'intégrité fonctionnelle des cellules du foie et le métabolisme des médicaments.

Ceci suggère que la solution SLS, qui n'est qu'une variante de la solution U.W., est suffisante pour obtenir les effets bénéfiques de préservation de la solution élaborée expérimentalement (Belzer et Southard, 1988). Donc certains composants de la solution U.W. ne peuvent apporter aucun impact bénéfique comparé à la solution SLS à composition beaucoup plus simple. Une approche intéressante pourrait être établie sur une solution aussi simple que la SLS à laquelle des agents pharmacologiques et cytoprotecteurs peuvent être ajoutés. Ceci permettra de maintenir l'efficacité des fonctions hépatiques et d'améliorer la survie des greffes du foie, menant ainsi à un meilleur pronostic de la transplantation du foie.

TABLE DES MATIERES

	Page
SOMMAIRE	IV
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES TABLEAUX	XV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XVII
DÉDICACE	XVIII
CHAPITRE 1: INTRODUCTION	1
1.1. ANATOMIE	2
1.1.1. Macroscopie	2
1.1.2. Microscopie	2
1.1.3. Ultrastructure	3
1.2. GÉNÉRALITÉS SUR LE VOLUME CELLULAIRE ET LE MÉTABOLISME DES MÉDICAMENTS	3
1.2.1. Facteurs influençant le volume des hépatocytes	3
1.2.1.a. Choc hypotonique - hypertonique et les mécanismes de régulation du volume	4
1.2.1.b. Choc osmotique physiologique : Acides aminés Na ⁺ dépendants	4
1.2.1.c. Hormones pancréatiques (Insuline - Glucagon)	8
1.2.2. Le métabolisme des médicaments au niveau du foie	10
1.2.2.a. Système cytochrome P-450	10
1.2.2.b. Variations du système relié au cytochrome P-450	13
1.2.2.b.i. Induction	13
1.2.2.b.ii. Répression du cytochrome P-450	16
1.2.2.b.iii. Facteurs physiologiques et pathologiques influençant le cytochrome P-450	18

1.3. TRANSPLANTATION HÉPATIQUE	19
1.3.1. Définition du candidat à la transplantation du foie	21
1.3.2. État présent de la transplantation hépatique.....	21
1.3.3. Les facteurs de risque de l'échec de la transplantation hépatique.....	24
1.4. ISCHÉMIE ET TRANSPLANTATION HÉPATIQUE	26
1.4.1. Définition.....	28
1.4.2. Effet de l'ischémie sur les cellules parenchymateuses	28
1.4.2.a. Ischémie chaude	28
1.4.2.b. Ischémie froide	31
1.4.3. Effet de l'ischémie sur les cellules endothéliales et les cellules de Küpffer	32
1.4.4. Effet de l'ischémie sur le système relié au cytochrome P-450	32
1.5. SOLUTION DE PRÉSERVATION	34
1.5.1. Objectifs.....	34
1.5.1.a. Clinique.....	34
1.5.1.b. Fondamental.....	35
1.5.2. Différentes étapes de l'évolution des solutions de préservations	35
1.5.2.a. Solution Euro-Collins (EC).....	35
1.5.2.b. Solution de l'Université de Wisconsin (U.W.).....	37
1.5.2.c. Modification de la solution U.W.	40
1.5.2.c.i. La solution U.W. sans HES.....	40
1.5.2.c.ii. La solution Histidine-Lactobionate (HL).....	41
1.5.2.c.iii. La solution Sodium Lactobionate Sucre (SLS)	41
1.6. HYPOTHÈSE DE L'ÉCHEC DE LA TRANSPLANTATION HÉPATIQUE	42
1.7. APPROCHE ET BUT DU TRAVAIL	42
CHAPITRE 2	47
EFFECTS OF COLD PRESERVATION AND REWARMING ON RAT LIVER CELL VOLUME REGULATION AND	
CONCENTRATIVE AMINO ACID UPTAKE	48

GRANT SUPPORT.....	48
ABBREVIATIONS.....	48
ADDRESS CORRESPONDENCE TO :	48
ABSTRACT	49
INTRODUCTION	51
MATERIALS AND METHODS	53
<i>Cell Isolation, Preservation and short-term Culture</i>	53
<i>Experimental Solutions and Protocols</i>	54
<i>Measurement of Cell Volume</i>	55
<i>Data analysis and statistics</i>	56
RESULTS.....	57
<i>Cell viability and Morphological Integrity.</i>	57
<i>Liver Cell Volume Regulation</i>	58
<i>Concentrative Amino Acid Uptake</i>	59
DISCUSSION.....	61
ACKNOWLEDGEMENTS	66
REFERENCE LIST	67
CHAPITRE 3.....	87
COMPARATIVE EFFECTS OF U.W. AND SLS SOLUTIONS ON CONCENTRATIVE PROLINE UPTAKE IN	
COLD PRESERVED RAT HEPATOCYTES.....	88
GRANT SUPPORT	88
ABBREVIATIONS.....	88
ABSTRACT	89
INTRODUCTION.....	91
MATERIALS AND METHODS:	92
<i>Cell isolation, preservation and short-term culture</i>	92
<i>Experimental solutions and protocols</i>	95

<i>Measurement of cell volume</i>	95
<i>Data analysis and statistics</i>	96
RESULTS	96
<i>Dose-response relationship of proline-induced cell swelling</i>	96
<i>Effect of cold preservation and of rewarming on cell viability and steady-state cell volume</i> :	97
<i>Effect of cold preservation time and solution on proline-induced cell swelling</i> :	99
DISCUSSION	101
REFERENCE LIST	104
CHAPITRE 4	110
CYTOCHROME P-450 CONTENT AND ACTIVITY AFTER COLD STORAGE OF RAT HEPATOCYTES IN UNIVERSITY OF WISCONSIN AND SODIUM-LACTOBIONATE-SUCROSE SOLUTIONS	111
GRANT SUPPORT	111
ABSTRACT	112
INTRODUCTION	113
MATERIALS AND METHODS	115
<i>Cell isolation, preservation and short-term culture</i>	115
<i>Cytochrome P-450 content and activity</i>	115
<i>Data analysis and statistics</i>	116
RESULTS	117
<i>cell viability</i>	117
<i>Cytochrome P-450 content</i>	117
<i>Theophylline metabolism</i>	119
DISCUSSION	119
REFERENCE LIST	124

CHAPITRE 5: DISCUSSION	134
5.1. EFFET DE LA PRÉSERVATION À FROID (4C) ET LE RÉCHAUFFEMENT À (37 C) SUR LES MÉCANISMES DE LA RÉGULATION DU VOLUME SUITE À UN CHOC HYPOTONIQUE SUIVIE D'UNE PHASE D'HYPERTONICITÉ RELATIVE.....	135
5.2. EFFET DE LA PRÉSERVATION À FROID (4° C) ET LE RÉCHAUFFEMENT (37° C) SUR LE GONFLEMENT CELLULAIRE INDUIT PAR L'ENTRÉE DES ACIDES AMINÉS NA⁺ DÉPENDANT	139
5.3. COMPARAISON DE DEUX SOLUTIONS DE PRÉSERVATION : : LA SOLUTION DE L'UNIVERSITÉ DE WISCOSIN (U.W.) ET LA SOLUTION SODIUM –LACTOBINATE-SUCROSE (SLS).....	145
5.3.1.Effet de la préservation à froid et du réchauffement sur le gonflement cellulaire induit par l'entrée de proline Na ⁺ dépendant	147
5.3.2.Effet de la préservation à froid et la reperfusion à chaud sur l'intégrité du système mono-oxygénase dépendant du cytochrome P-450.....	149
CHAPITRE 6: CONCLUSION.....	154
CHAPITRE 7: PERSPECTIVES D'AVENIR	158
7.1. AGENTS PHARMACOLOGIQUES.....	159
7.1.1. Substances nutritives (Adénosine-Fructose).....	159
7.1.2. Inhibiteurs calciques.....	160
7.1.3. Inhibiteurs de protéase	161
7.1.4. Acides aminées	161
7.2. THÉRAPEUTIQUE GÉNIQUE.....	162
RÉFÉRENCES	163
CURRICULUM VITÆ	0

LISTE DES FIGURES

Page

CHAPITRE 1

Figure 1.1: Les mécanismes de régulations de volume cellulaire suite à un choc osmotique.....	5
Figure 1.2: Les différents systèmes d'acides aminés exprimés sur les membranes plasmiques des cellules du foie.....	7
Figure 1.3: Les effets des hormones pancréatiques sur les mécanismes de régulation du volume cellulaire.....	9
Figure 1.4: Représentation schématique de la réaction d'hydroxylation catalysée par le système des oxygénases à fonction mixte (mono oxygénase).....	11
Figure 1.5: Régénérescence des cellules hépatiques.....	20
Figure 1.6: Développement exponentiel de la transplantation hépatique.....	23
Figure 1.7: Effet de l'ischémie chaude et froide sur les cellules parenchymateuses.....	29
Figure 1.8: Hypothèse de l'échec de la transplantation hépatique.....	43
Figure 1.9: Techniques de mesure du volume hépatocellulaire par la technique de vidéoplanimétrie	46

CHAPITRE 2

Figure 2.1: Effect of hypotonic stress on liver cell volume. 78

Figure 2.2: Effect of cold preservation and rewarming on RVD (A) and RVI (B) after
hypotonic stress and return to isotonicity..... 80

Figure 2.3: Effects of Na⁺-dependent amino acid uptake on cell volume of isolated
hepatocytes. 83

CHAPITRE 3

Figure 3.1: Effect of proline concentration on the initial swelling rate in isolated rat
hepatocytes..... 106

Figure 3.2: Effect of cold-preservation time and of rewarming on the viability of rat
hepatocytes stored in University of Wisconsin (A) or Sodium-lactobionate-
sucrose (B) solutions. 108

CHAPITRE 4

Figure 4.1: Effect of hepatocyte preservation in U.W. or SLS solutions for variable time
periods on the total cellular content in cytochrome P-450. 128

Figure 4.2: Effect of hepatocyte preservation in U.W. or SLS solutions for variable time
periods on the metabolism of theophylline to 1,3-dimethyluric acid. 130

Figure 4.3: Effect of hepatocyte preservation in U.W. or SLS solutions for variable time periods on the concentration of unmetabolized theophylline.	132
---	-----

CHAPITRE 5

Figure 5.1: Effet du glucagon sur le système A Na ⁺ dépendant.	142
--	-----

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau I: Principales familles de cytochrome P-450 induites par les xénobiotiques chez le rat.....	14
Tableau II: Les indications de la transplantation hépatique.....	22
Tableau III: Les différentes causes de la mort suite à une transplantation hépatique dans un milieu pédiatrique.....	25
Tableau IV: Les facteurs de risques absolus et relatifs de rejet de greffe suite à une transplantation hépatique.....	27
Tableau V: Différentes étapes de l'évolution des solutions de préservation	36
Tableau VI: Composition de deux solutions de préservation: la solution de l'Université de Wiscosin (U.W.) et la solution sodium -lactobionate-sucrose (SLS)...	38
Table VII: Effect of cold preservation and rewarming on cell viability and morphological integrity.....	73
Table VIII: Effect of cold preservation and rewarming on regulatory volume decrease.....	74
Table IX: Effect of cold preservation and rewarming on regulatory volume increase ..	75

Table X:	Effect of cold preservation and rewarming on Na ⁺ dependent amino acid-induced cell swelling.....	76
Table XI:	Effect of cold preservation and rewarming on morphological integrity of hepatocytes after concentrative amino acid uptake	77
Table XII:	Composition of Liver Preservation Solutions.....	94
Table XIII:	Effects of cold preservation time and solution on steady-state volume and on maximal volume in isolated rat hepatocytes treated with 10 mM Proline...	98
Table XIV:	Effect of Cold Preservation Time and Solution on the Initial Rate of Cell Swelling Induced by Concentrative Proline Uptake in Isolated Rat Hepatocytes.....	100
Table XV:	Effect of cold storage time in U.W. or SLS solutions on cell viability before and after rewarming	118
Tableau XVI:	Effet de la préservation à froid et du réchauffement sur la viabilité et les mécanismes de régulation du volume hépatocellulaire.....	140

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ACV:	augmentation compensatrice du volume
AIB:	α -aminobutyric acid
ANOVA:	analysis of variance
DCV:	diminution compensatrice du volume
EC:	Euro-Collins
HEPES:	4-(2-hydroxy-ethyl)-1-piperazine-ethane sulfonic acid
HES:	Hydroxyéthyl amidon
HL:	Histidine-Lactobionate
KHB:	Krebs-Henseleit buffer
NFP:	non-fonction primaire
PDF:	Dysfonctionnement primaire
REL:	réticulum endoplasmique lisse
RER:	réticulum endoplasmique granulaire
SLS:	Sodium-lactobionate-sucrose
TNF:	Necrosis Factor
U.W.:	University of Wisconsin

DÉDICACE

***À MON MARI,
MON AMOUR POUR TOI N'A D'ÉGAL
QUE MON RESPECT ET MON ESTIME***

***À MON PÈRE, À MA MÈRE
AVEC MA PROFONDE AFFECTION***

***À MA FAMILLE ET MA BELLE-FAMILLE,
POUR VOTRE SOUTIEN ET VOTRE COMPRÉHENSION***

***À MES AMI(E)S
MERCİ D'ÊTRE VOUS***

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1. ANATOMIE

1.1.1. Macroscopie

Le foie adulte chez l'humain pèse entre 1400 et 1600 g, soit le 1/50 du poids du corps. Il est formé de deux lobes anatomiques, le droit et le gauche, séparé par l'insertion du ligament falciforme. La distribution du pédicule vasculaire et biliaire à travers le foie permet de diviser celui-ci en huit segments. L'apport sanguin au foie est double :

- ◆ La veine porte, née de la confluence de la veine splénique, de la veine mésentérique inférieure et de la veine mésentérique supérieure, apporte au foie le sang de la rate et du tube digestif.
- ◆ L'artère hépatique, née du tronc cœliaque, apporte au foie le sang artériel. Le sang est drainé, pour sa plus grande part, par les veines sus-hépatiques.

1.1.2. Microscopie

Les cellules parenchymateuses hépatiques ou hépatocytes sont des cellules polyédriques de 25 à 30 μm de diamètre, disposées en lames. Ces lames délimitent les sinusoides à l'intérieur desquels se fait la circulation sanguine. Les sinusoides sont bordés par des cellules de plusieurs types :

- ◆ les cellules de Küpffer à propriétés phagocytaires,
- ◆ les cellules endothéliales à fonction de pinocytose et enfin
- ◆ les cellules de Ito qui sont nombreuses, contiennent des inclusions lipidiques et jouent un rôle dans la formation de fibres de collagène.

1.1.3. Ultrastructure

L'hépatocyte est délimité par une membrane cellulaire qui présente des microvillosités à son pôle vasculaire et biliaire. Le cytoplasme contient différents organites

- a) Les mitochondries.
- b) Le réticulum endoplasmique.
 - ◆ Sa face externe est bordée de ribosomes : réticulum endoplasmique granulaire (RER).
 - ◆ Dans d'autres zones les ribosomes sont absents : réticulum endoplasmique lisse (REL). Ce dernier, contient les enzymes d'hydroxylation et de conjugaison qui jouent un rôle important dans le métabolisme des médicaments et dans l'homéostasie du calcium intracellulaire.
- c) L'appareil de Golgi : Système vésiculaire, à travers lequel transitent les protéines fabriquées par le réticulum endoplasmique et sécrétées dans le plasma.
- d) Les lysosomes, vésicules contenant des enzymes lytiques, qui jouent un rôle important dans la digestion et la destruction des résidus cellulaires.
- e) Les ribosomes libres, c'est-à-dire indépendant du réticulum endoplasmique granulaire, qui jouent un rôle important dans la synthèse des protéines de l'hépatocyte.
- f) Les grains de glycogène.

1.2. GÉNÉRALITÉS SUR LE VOLUME CELLULAIRE ET LE MÉTABOLISME DES MÉDICAMENTS

1.2.1. Facteurs influençant le volume des hépatocytes

Notre étude s'intéresse particulièrement à la régulation du volume chez l'hépatocyte, un élément très important dans le maintien du fonctionnement normal de la

cellule. Plusieurs mécanismes de transport ont été impliqués dans la régulation du volume cellulaire.

1.2.1.a. Choc hypotonique - hypertonique et les mécanismes de régulation du volume cellulaire

Normalement, les cellules en suspension ou en culture, soumises à un choc hypotonique gonflent rapidement. Ces cellules perdent passivement des ions de K^+ et de Cl^- à travers des canaux parallèles de K^+ et de Cl^- , par un échange K^+/H^+ et Cl^-/HCO_3^- (Graf et coll., 1988 ; Lang et coll., 1989), provoquant ainsi une diminution compensatrice du volume (DCV) (Figure 1.1). Dans le cas d'un choc hyperosmotique, les cellules rétrécissent. Ceci entraîne une activation de la pompe Na^+/K^+ (Haddad et Graf, 1989 ; Corsanti et coll., 1990). Le cotransporteur $Na^+/K^+/2Cl^-$, et les échangeur Na^+/H^+ et Cl^-/HCO_3^- sont aussi activés, alors que la perméabilité aux ions de K^+ est diminuée. Ceci se traduit par une rétention de KCl qui attire l'eau dans la cellule. Ce phénomène est appelé une augmentation compensatrice du volume (ACV).

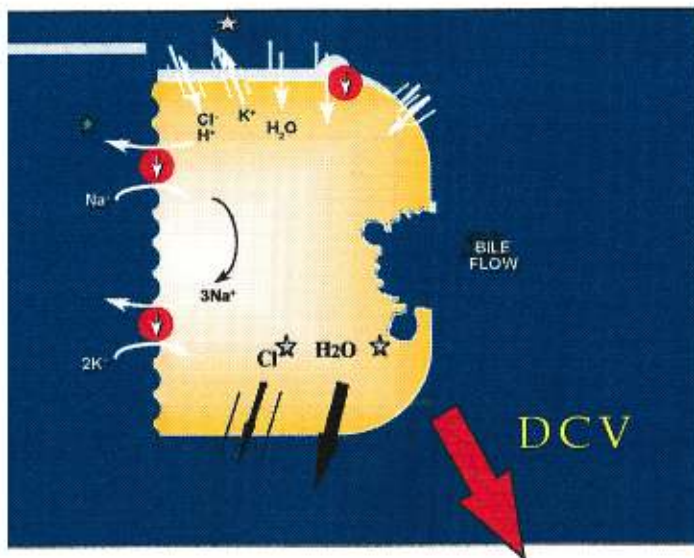
1.2.1.b. Choc osmotique physiologique : Acides aminés Na^+ dépendants

Bien que les chocs osmotiques aient été très utiles pour étudier les mécanismes de régulation de volume au niveau hépatique, ils ne sont pas physiologiques. Par contre, l'accumulation des acides aminés correspond à une situation physiologique qui engendre un stress osmotique intracellulaire. En fait, plusieurs études ont démontré que l'entrée de certains acides aminés provoque le gonflement des cellules du foie (Kristensen, 1986 ; Baquet et coll., 1990). Ceci peut avoir une influence profonde sur la fonction métabolique

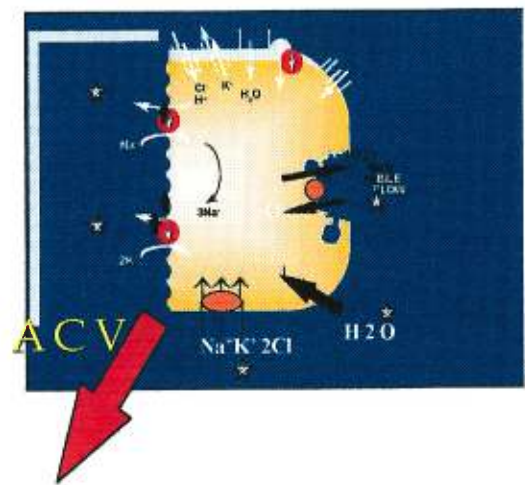
Figure 1.1

Les mécanismes de régulations de volume cellulaire suite à un choc osmotique

Diminution compensatrice du volume



Augmentation compensatrice du volume



**Volume normal
de l'hépatocyte**

(Haeussinger et Lang, 1991; Baquet et coll., 1990 ; Meijer et coll., 1992 ; Collins et Wicomb, 1992).

Le foie joue un rôle important dans le métabolisme des acides aminés, dont l'entrée intracellulaire est une étape cruciale pour les fonctions hépatocellulaires comme la gluconéogenèse et la synthèse du glycogène (Moseley, 1993 ; Kristensen, 1990). On distingue huit systèmes d'acides aminés qui sont exprimés sur les membranes plasmiques des cellules du foie (Figure 1.2). Cette distinction est basée sur la spécificité de leur substrat, ainsi que sur leur dépendance au Na^+ et la régulation par les hormones pancréatiques.

L'activité du système A est modulée par les hormones. L'alanine est le substrat modèle pour ce système de transport. Les analogues non-métabolisables de l'alanine, l'acide α -amino-isobutyrique (AIB) et α -méthylamino-isobutyrique (MeAIB) sont généralement utilisés pour l'étude de transport du système A.

Le système N de transport d'acides aminés semble être spécifique au foie et son substrat préférentiel est la glutamine (Bodet et Kilberg, 1991). Ce substrat est l'acide aminé le plus abondant dans la circulation et il entraîne un gonflement cellulaire rapide. Le système N peut être aussi régulé par les hormones pancréatiques comme l'insuline, le glucagon et la déprivation en acide aminé (Gebhardt et Kleemanng, 1987).

Le système ASC permet le transport de petits acides aminés neutres contenant particulièrement des groupements hydroxyle ou sulfhydryle. Kilberg et coll. (1979) ont démontré l'utilité de la cystéine, de la serine et de la proline comme substrats

Figure 1.2

Les différents systèmes d'acides aminés exprimés sur les membranes
plasmiques des cellules du foie



Adapté de Moseley (1993)

préférentiels du système ASC Na^+ dépendant. La proline est un acide aminé qui stimule le gonflement des hépatocytes et conduit à une grande stimulation de la synthèse du glycogène. Contrairement au système A et N, la régulation hormonale n'est pas observée pour le système ASC.

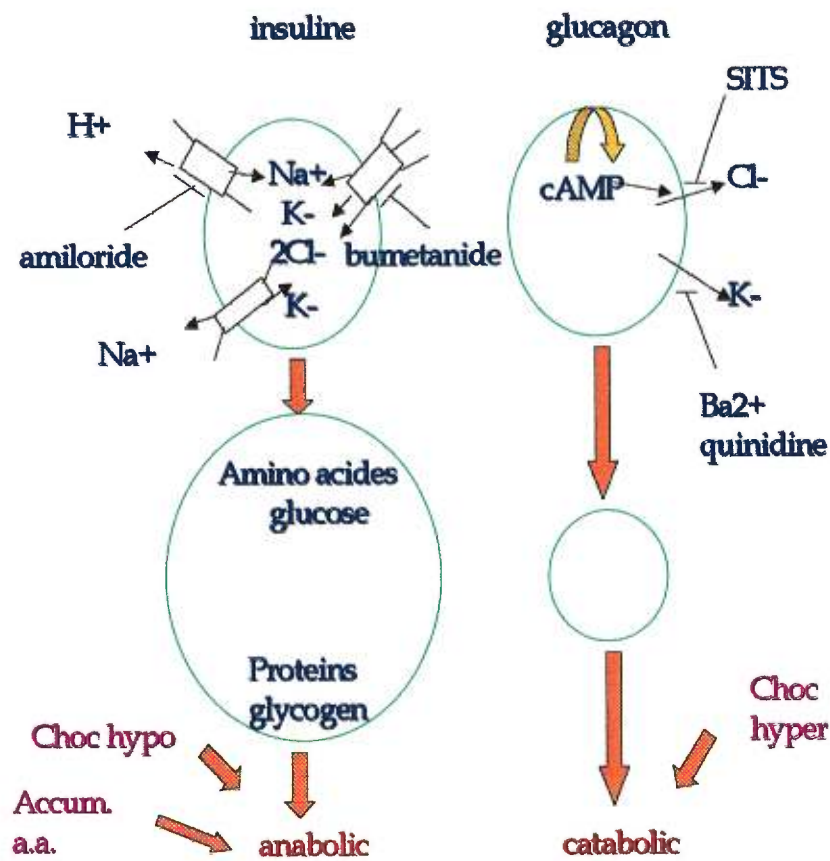
1.2.1.c. Hormones pancréatiques (Insuline - Glucagon)

Selon une hypothèse formulée par de Haeussinger et Lang (1991) le volume cellulaire n'est pas une composante passive, mais pourrait jouer un rôle important dans la régulation du métabolisme hépatique. En fait, ces auteurs ont observé que l'augmentation du volume induite par un choc hypotonique entraînait un métabolisme anabolique alors que le rétrécissement cellulaire lors d'un choc hypertonique induisait un métabolisme catabolique (Figure 1.3). Par ailleurs ils ont trouvé que l'insuline cause un gonflement hépatocellulaire, effet inexistant après l'ajout de l'amiloride et la bumétamide, qui sont respectivement les inhibiteurs de l'échangeur Na^+/H^+ et du cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (Hallbrucker et coll., 1991, Haeussinger et Lang, 1991 ; Haeussinger et coll., 1991). Pour sa part, le glucagon entraîne un rétrécissement. Cet effet disparaît en présence de SITS (un inhibiteur des canaux de Cl^-) (Haddad et coll., 1991), du Ba^{2+} et de la quinidine (inhibiteurs des canaux potassium) (Hallbrucker et coll., 1991).

On a ainsi émis l'hypothèse que les hormones pancréatiques provoquent des changements volumiques qui affectent ensuite le métabolisme. Nos premières expériences (Serrar et coll., 1993) ont confirmé les résultats de Haeussinger et coll. (1990).

Figure 1.3

Effets des hormones pancréatiques et des chocs osmotiques sur les mécanismes de régulation du volume cellulaire



-Le gonflement induit par l'insuline est inexistant après l'ajout de l'amiloride et la bumetanide.

-le rétrécissement causé par le glucagon disparaît en présence de SITS, du Ba^{2+} et de la quinidine.

-Un choc hypotonique provoque une augmentation du volume cellulaire entraînant un métabolisme anabolique. Par contre, un choc hypertonique provoque un rétrécissement cellulaire induisant un métabolisme catabolique.

Par contre, l'effet des hormones pancréatiques ne devenait significatif qu'après un délai minimum de 20 minutes, ce qui est en accord avec un travail récent (Gaussin et coll., 1992) montrant que les effets métaboliques du glucagon sont précoces (1-5 minutes) alors que ses effets volumiques sont tardifs (30 minutes).

1.2.2. Le métabolisme des médicaments au niveau du foie

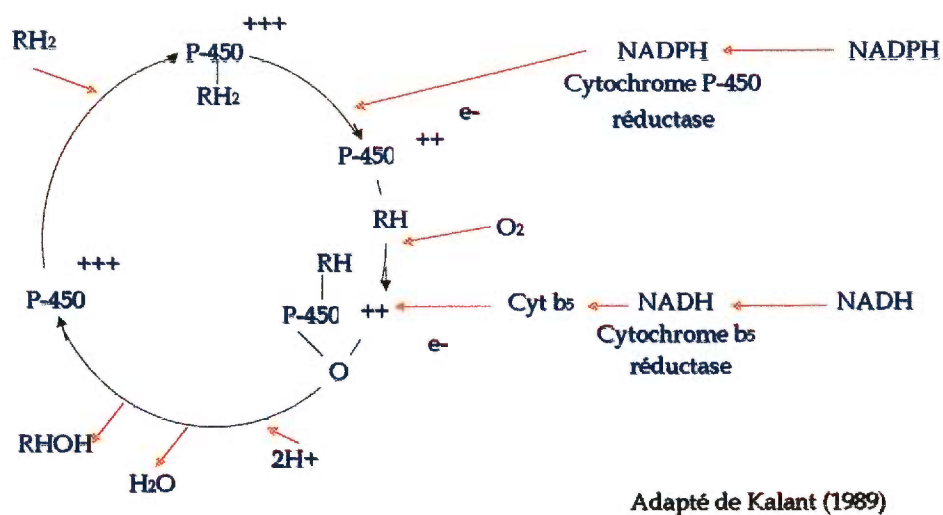
1.2.2.a. Le Système lié au cytochrome P-450

Les principaux organes, où on trouve les enzymes de biotransformation des médicaments, sont le foie, le tractus gastro-intestinal, le rein et le poumon. Le foie représente le site majeur de biotransformation enzymatique des substances liposolubles endogènes et exogènes. Les différentes réactions de biotransformation sont regroupées en phase I et phase II. Les métabolites produits en phase I et II possèdent une plus grande hydrosolubilité et forment des substances plus facilement excrétables par le rein (Benet et coll., 1990). Les principales composantes du système d'oxygénase observées dans les microsomes du foie (mis en évidence par Lu et Coon, 1968) sont : l'hémoprotéine cytochrome P-450, la flavoprotéine NADPH cytochrome P-450 réductase, la flavoprotéine NADH cytochrome b5 réductase et le cytochrome b5, liés aux phospholipides et aux différentes cytochrome P-450 réductase.

La majeure partie du système enzymatique se trouve dans le REL, catalysant la biotransformation des médicaments. Le seul critère pour être biotransformé par ces enzymes, en particulier les oxydases, est la liposolubilité. Le substrat se lie à la forme oxydée du cytochrome P-450, formant un complexe RH₂-cytochrome P-450 (Figure 1.4).

Figure 1.4

Représentation schématique de la réaction d'hydroxylation catalysée par le système des oxygénases à fonction mixte (mono-oxygénase)



Le fonctionnement de ce système requiert de l'oxygène moléculaire, une phase phospholipidique dans laquelle il doit être encastré et l'intégrité d'un système donneur d'électrons impliquant la participation d'une enzyme appelée NADPH-cytochrome P-450 réductase.

Compte tenu de l'implication du cytochrome P-450 dans le métabolisme des médicaments et des composés potentiellement toxiques ou carcinogènes, beaucoup d'efforts ont été entrepris pour purifier et caractériser ce cytochrome. Le raffinement des techniques d'isolement et d'analyse ont permis la caractérisation du cytochrome P-450 de formes et d'activités différentes. Cette observation est venue appuyer l'hypothèse d'une multiplicité de formes de cytochrome P-450 nommés isoenzymes (Lu et Coon, 1968 ; Noshiro et Omura, 1978). Les isoenzymes du cytochrome P-450 sont regroupées sous une nomenclature unique, basée sur la séquence d'acides aminés (Nebert et coll., 1987).

De nombreux xénobiotiques sont transformés par le cytochrome P-450 en métabolites stables. D'autres se transforment au contraire en métabolites réactifs (Guengerich et Libler, 1985). Ces derniers peuvent être mutagènes, cancérigènes ou entraîner des lésions tissulaires, en particulier des hépatites (Pessayre et coll., 1992 ; Pessayre, 1993). Ces réactifs intermédiaires peuvent être formés par trois types de réactions :

- ◆ le cytochrome P-450, sous sa forme oxydée active, peut oxyder le médicament en métabolite réactif électrophile (par exemple l'oxydation du paracétamol en quinone)
- ◆ Le cytochrome P-450, sous sa forme réduite (le fer de l'hème étant à l'état de Fe^{+2}) et n'ayant pas fixé l'oxygène (en particulier, en milieu anaérobie), est un assez bon réducteur qui peut catalyser une halogénéation réductrice de divers alcanes halogènes, (tel que le tétrachlorure de carbone ou l'halotane) en radicaux libres.
- ◆ La NADPH-cytochrome P-450 réductase lui-même peut réduire quelques médicaments en radicaux libres (formation par exemple, de radicaux semi-quinones à

partir de quinones, formation de radicaux nitro-anions à partir de nitroarènes). Ces radicaux peuvent à leur tour réduire l'oxygène moléculaire en anions super-oxydes (O_2^-) responsable de la formation d'autres espèces réactives de l'oxygène (H_2O_2, OH) et d'un stress oxydatif (Berson et coll., 1991 ; Fau et coll., 1992).

Un tel système (le cytochrome P-450) n'aurait pu être mis en place sans le développement, préalable ou concomitant de divers mécanismes de protection contre la formation de nombreux métabolites réactifs potentiellement toxiques. Parmi ces mécanismes de protection, il y a l'inactivation du cytochrome P-450 (Holpert et coll., 1983 ; Ortiz et coll., 1981), la transformation du métabolite réactif en métabolites stables (Oesch, 1972), la protection contre les espèces réactives de l'oxygène et la protection contre la peroxydation lipidique (Larson et coll., 1993).

1.2.2.b. Les variations du système relié au cytochrome P-450

1.2.2.b.i Induction

Les dix dernières années ont été marquées par le progrès des connaissances concernant les mécanismes moléculaires de l'induction et la répression du cytochrome P-450. Ces progrès concernent les récepteurs impliqués dans l'induction, la régulation transcriptionnelle, les mécanismes de stabilisation des ARN messagers et des protéines. Seules certaines isoenzymes sont inductibles, et non pas toutes (Tableau I).

Tableau I

Principales familles de cytochrome P-450 induites par les xénobiotiques
chez le rat

<i>ISOENZYMES</i>	<i>TYPES D'INDUCTEURS</i>
CYP1A1 CYP1A2	TCDD, 3-MC, isosafrole
CYP2A1 CYP2A2	β - naphthoflavone
CYP2B1 CYP2B2	Phénobarbital, BPC
CYP3A1 CYP3A2	PCN
CYP4A1 CYP4A2 CYP4A3	Clofibrate
CYP2E1	Éthanol, acétone, isoniazide

Les inducteurs principaux sont habituellement répartis en cinq groupes en raison de leur mode d'action : les hydrocarbures polycycliques, le phénobarbital, les glucocorticoïdes, l'alcool et les proliférateurs de peroxyosomes. L'induction peut accélérer le métabolisme de divers stéroïdes naturels ou synthétiques, de vitamines, de prostaglandines et de médicaments. Le processus d'induction est principalement de nature transcriptionnelle. Il requiert la présence d'un récepteur. En premier, deux récepteurs ont été identifiés chez le rat : le récepteur AH également nommé récepteur de la dioxine ou récepteur 8S, se liant avec la dioxine ou le 3-méthylcholanthrénone (Poland et coll., 1976) et la protéine 4S qui se combine plus particulièrement avec le benzopyrène (Tierney et Coll., 1983 ; Houser et coll., 1985). Ces récepteurs sont impliqués dans le transfert du ligand vers le noyau cellulaire et interagissent avec les éléments cis-régulateurs localisés dans les régions 5' voisines du gène. Comparé avec le récepteur AH qui contrôle la régulation du CYP1A1 (Denison et Whitlock, 1995), le mécanisme par lequel le phénobarbital induit la transcription du CYP2B vient d'être élucidé (Honkakoski et coll., 1998(a)). Le phénobarbital est un inducteur enzymatique de plusieurs isoformes du cytochrome P450 ; CYP2A, CYP2B, CYP2C and CYP3A avec induction plus marquée pour le CYP2B (Denison et Whitlock, 1995 ; Honkakoski et Negishi, 1997). Récemment, l'augmentation de l'activité de la réponse du phénobarbital a été associée avec les séquences de l'ADN, dans le gène CYP2B2 pour le rat et Cyp2b10 pour la souris (Honkakoski et Negishi, 1997 ; Honkakoski et Negishi, 1998 ; Park et coll., 1996 ; Trottier et coll., 1995). Les séquences de l'ADN localisées entre bp-2339 à -2289 du gène Cyp2b10 ont été désigné comme le module augmentant la réponse du phénobarbital (phenobarbital responsive enhancer module-PBREM) (Honkakoski et

Negishi, 1997 ; Honkakoski et Negishi, 1998 ; Honkakoski et coll., 1998 (b)). Le PBREM est induit par les substances de types de phénobarbital 1,4-bis [2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzène (TCPOBOP), les biphenyls polychlorinated (BPC), les solvants organiques et quelques extraits des plantes comme le camphore (Honkakoski et coll., 1998 (b)). Le PBREM contient des sites de liaisons du récepteur nucléaire NR1 et NR2, situé proximité du facteur nucléaire 1 (NF1). Des mutations spécifiques des sites NR ont entraîné une perte complète de la réponse du PBREM et des inducteurs types phénobarbital (Honkakoski et Negishi, 1997 ; Honkakoski et coll., 1998 (b)). Dans une étude récente, Honkakoski et coll. (1998(a)) ont identifié, suite à une réponse de l'induction au phénobarbital, des récepteurs orphans nucléaires type CAR et rétinol X (RXR) qui se lie au récepteur nucléaire (NR) du PBREM. Le récepteur CAR-RXR est un récepteur hétérodimère qui a été caractérisé comme un facteur agissant en trans pour l'induction du gène Cyp2b10 causé par le phénobarbital (Honkakoski et coll., 1998(a)).

1.2.2.b.ii. Répression du cytochrome P-450

Le phénomène inverse, la répression de la synthèse des cytochromes P-450, est moins bien connu ; les cytokines sont un exemple de répresseur et cette répression paraît atteindre de façon non-spécifique de nombreux cytochromes P-450 :

- ◆ **Répression de la transcription** : Les inhibiteurs de la synthèse des protéines répriment la synthèse des cytochromes P-450. Parmi eux le cycloheximide, répresseur de la transcription. Ce dernier peut être à la fois un inducteur des cytochromes P-450 3A1 et 2E1, et un répresseur du cytochrome P-450 2B1-2 (Burger et coll., 1990). Parmi les cytokines, l'interleukine-6 est capable d'un effet transcriptionnel

empêchant l'induction du cytochrome P-450 2B1 dans des hépatocytes murins en culture primaire (William et coll., 1991). Wright et Morgan (1991) ont également montré une diminution de la transcription du gène du cytochrome P-450 2C11 chez le rat mâle sous l'influence de l'interleukine-1-alpha, et de celui du cytochrome P-450 2C12 par un inducteur d'interféron (Knickle et coll., 1992). De même, Baker et coll. (1992) ont mis en évidence une baisse de la transcription du gène du cytochrome P-450 1A1 dans les hépatocytes murins en culture primaire préinduits par le méthyl-3-cholantheuresène, lors de traitement avec l'interleukine-1.

- ◆ **Répression de la traduction** : L'actinomycine-D ou la puromycine est un des répresseurs de la traduction.
- ◆ **Répression de la protéine** : Le cytochrome P-450 peut être régulé en modifiant la stabilité de la protéine (Porter et Coon, 1992). En effet, certains mécanismes augmentent sa dégradation en le modifiant pour être plus facilement détruite par les enzymes (hème oxygénase). Les ions métalliques, tels le cobalt, le manganèse, le cadmium ou le cuivre, inhibent la synthèse de l'hème et surtout augmentent l'activité de l'hème oxygénase (Testa et Jenner, 1981). Cette enzyme qui dégrade le cytochrome P-450 ne peut agir que si le cytochrome P-450 est déjà transformé en cytochrome P-420. Le passage de P-450 à P-420 implique la phosphorylation par de phosphokinases telle que la PKC (Pyerin et Taniguchi, 1989), et la PKA (Pyerin et coll., 1987). De plus il a été démontré clairement que l'inactivation des cytochromes P-450 par des produits inducteurs des phosphokinases nucléotide-dépendants était en relation directe avec une phosphorylation de la protéine (Oesch-Bartolomowicz et Oesch, 1990). Ce type

de régulation par phosphorylation serait impliqué dans la répression du cytochrome P-450 2B1 par l'interféron chez la souris (Stanley et coll., 1991)

1.2.2.b.iii. Facteurs physiologiques et pathologiques influençant le cytochrome P-450

Différents facteurs peuvent affecter l'activité et la quantité du cytochrome P-450, tels que les facteurs génétiques, l'âge, le sexe et les changements de diète (le jeûne). En effet, chez des rats soumis à une diète réduite à 5% en protéines pendant deux semaines, la quantité totale de cytochrome P-450 est diminuée (Yang et coll., 1992). De même, une diminution de 44% de protéines entraîne une diminution du taux de biotransformation de la théophylline (Anderson et coll., 1985). D'autres part, une diète accrue en hydrates de carbone, tels que le sucrose, le glucose ou le fructose, peut conduire à une diminution du taux de biotransformation de l'hexobarbital, et donc une augmentation de la durée d'anesthésie (Strother et coll., 1971). Par ailleurs, une déficience en lipide entraîne entre autres une réduction de la biotransformation du benzopyrène et une diminution de la quantité de cytochrome P-450 total, comparativement aux rats témoins nourris (Norred et Wade, 1972 ; Wade, 1986 ; Yoo et coll., 1992). Une autre étude montre qu'un jeûne de 2 à 3 jours chez le rat mâle entraîne une diminution de 50% du cytochrome P-450 2C1 (Ma et coll., 1989).

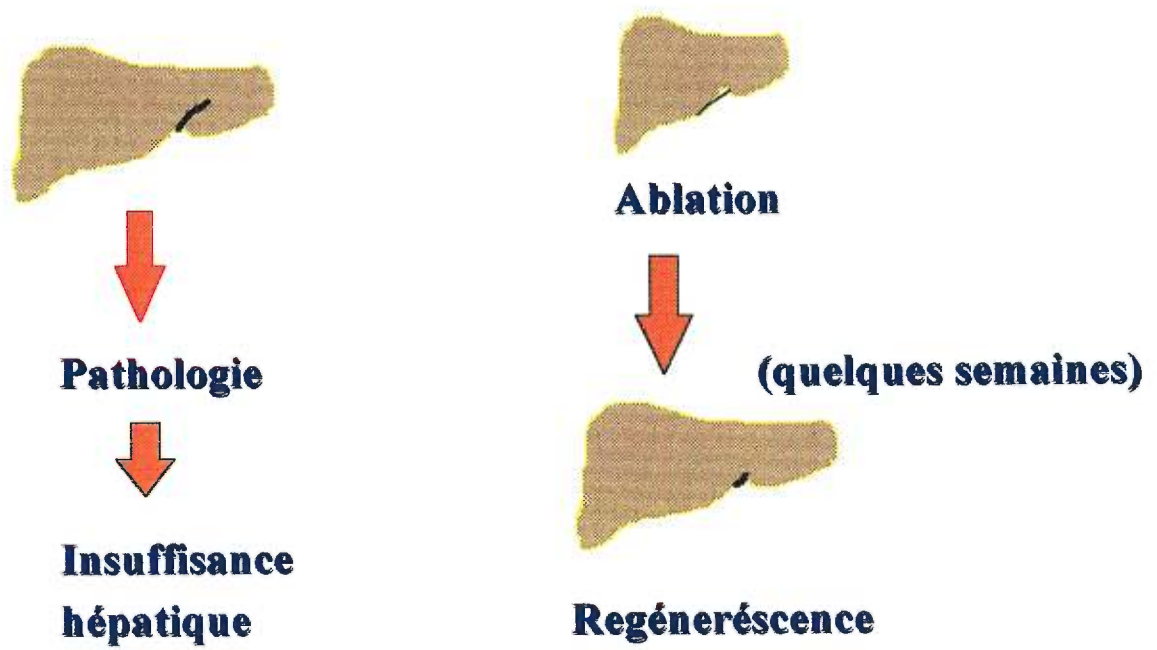
Certaines pathologies peuvent altérer l'activité et la quantité de cytochrome P-450. En effet une cirrhose nutritionnelle réduit de 50% la quantité de cytochrome P-450 totale hépatique (Murray et Reidy, 1990). Aussi, chez les patients cirrhotiques, les isoformes 1A2 et 2E1 sont diminuées (Guengerich et Turvy, 1991). Barakat et du Souich, (1996) ont démontré qu'une réaction inflammatoire, induite par une injection sous-

cutanée de térébenthine, réduit la clairance systémique de la théophylline, la quantité totale de cytochrome P-450 hépatique, et augmente la peroxydation des lipides dans le foie, telle qu'estimée par la quantité de MDA. Il a été démontré qu'une hypoxie aiguë de 24 heures chez le lapin réduit la clairance systémique de la théophylline, diminue la quantité de cytochrome P-450 et augmente la peroxydation des lipides intrahépatiques (Barakat et du Souich, 1996).

1.3. TRANSPLANTATION HÉPATIQUE

Le foie est doué d'une étonnante capacité de renouvellement. Un lobe entier enlevé lors d'une intervention est remplacé en quelques semaines (Figure 1.5). Cependant dans certaines pathologies, la destruction des cellules hépatiques excède le taux de renouvellement. La perte progressive des fonctions hépatiques aboutit à l'insuffisance hépatique décompensée, toujours mortelle dans un délai plus au moins long. Les conséquences de cette insuffisance sont faciles à imaginer en considérant les différentes fonctions du foie. Par exemple, le taux de sucre dans le sang baisse et des lésions cérébrales peuvent s'en suivre. On observe aussi une défaillance de la synthèse protéique incluant les protéines responsables de la coagulation, ce qui rend le patient hémorragique. Il n'y a pas de traitement de l'insuffisance hépatocellulaire. On ne connaît pas de thérapeutique capable de remplacer la cellule hépatique ou d'améliorer ses fonctions. La transplantation hépatique apparaît donc comme la seule solution salvatrice possible dans le cas de l'insuffisance hépatique. Elle représente toutefois une solution extrême, preuve de l'absence ou de l'échec de schémas thérapeutiques moins radicaux qui doivent, si possible, lui être privilégiée.

Figure 1.5

Régénérescence des cellules hépatiques

1.3.1. Définition du candidat à la transplantation du foie

Un candidat à une transplantation hépatique est *à priori* tout patient dont la vie est sérieusement compromise par une hépatopathie aiguë ou chronique, dès lors que toute autre forme de traitement médical ou chirurgical est inefficace, et chez lequel on ne décèle aucune contre-indication à la greffe (Tableau II). Parmi les indications de la transplantation hépatique, nous avons les hépatopathies chroniques au stade de cirrhose, les tumeurs non résécables, les affections métaboliques et les hépatites fulminantes, virales, toxiques ou médicamenteuses.

1.3.2. État présent de la transplantation hépatique

Dès le début des années 50, des transplantations hépatiques ont été effectuées avec succès chez le chien ou chez le porc. (Goodrich et coll., 1956 ; Terasaki, 1991). Mais l'application chez l'homme est restée longtemps au stade expérimental. Aujourd'hui la transplantation du foie n'est pas encore devenue une intervention chirurgicale de routine (Starzl et coll., 1989), mais elle est fréquemment effectuée puisque, depuis le début des années 90 jusqu'à présent, 45 transplantations du foie ont été pratiquées à l'hôpital St-Luc. La transplantation hépatique (TH) présente actuellement un développement exponentiel (Figure 1.6).

Le taux de succès de la transplantation hépatique est passé de 10-20 % durant les années 70 à 85-90 % pour les années 90. Le point de départ de cette amélioration est attribué à l'apparition de la cyclosporine (cy A) à partir de 1981 dans la lutte anti-rejet. Cependant, d'autres facteurs sont, peu à peu, intervenus :

Tableau II

Les indications de la transplantation hépatique

Hépatopathies chroniques irréversibles

dominance cholestatique

ose biliaire primitive

ose biliaire secondaire

insuffisance hépatocellulaire prédominante

ose post-hépatite virale

ose étylique

ose idiopathique, auto-immune

maladies génétiques

maladie polykystique

Tumeurs non résecables- limitées au foie:

carcinome hépatocellulaire

cholango-carcinome

tumeurs métastatiques isolées

Affection métaboliques

maladie de Wilson

déficit en α -1-antitrypsine

hémophilie

Hépatites fulminantes:

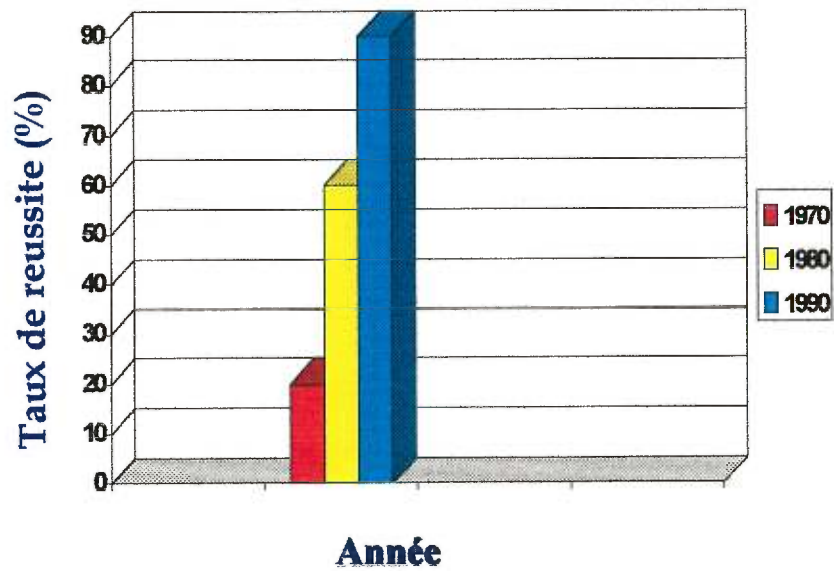
virales, A, B, Delta, non A-non B, EBV

toxiques ou médicamenteuses

métaboliques: Wilson...

Figure 1.6**Développement exponentiel de la transplantation hépatique**

(Données statistiques du centre de transplantation du foie, Hôpital St-Luc, Montréal, Qc)



- ◆ Le progrès en anesthésie – réanimation, une dimension de plus en plus impliquée.
- ◆ L'amélioration des médicaments anti-infectieux, car plus de 70% de décès après greffe durant la première année étaient dus aux complications infectieuses (VanThiel et coll., 1990 ; Kusne et coll., 1988).
- ◆ Les progrès de la technique chirurgicale.
- ◆ Amélioration des liquides de préservation à froid.

1.3.3. Les facteurs de risque impliqués dans l'échec de la transplantation hépatique

Des complications post-opératoires surviennent parfois pour des raisons inconnues, suite à une transplantation hépatique avec absence de reprise de la fonction du greffon. Cette non-fonction primaire (NFP) s'amorce dès la phase de la revascularisation par la survenue de coagulopathie ou d'une fibrinolyse, par la persistance d'une acidose, par une hyperkaliémie, ainsi qu'une hypoglycémie et une hypercalcémie. Ceci va entraîner le rejet du greffon et donc l'échec de la transplantation hépatique (Neuberger, 1995).

Des études faites en milieu pédiatrique (Khan et coll., 1989) ont montré qu'après une transplantation hépatique, la mort est due, dans 15% des cas, à un dysfonctionnement primaire (Tableau III). Ce dernier est attribué aux dommages causés par la préservation hypothermique du foie et à sa reperfusion à chaud, indépendamment de tous les problèmes post- ou pré-opératoires.

Tableau III

Les différentes causes de la mort suite à une transplantation hépatique
dans un milieu pédiatrique

***Causes of death after pediatric
liver transplantation***

◆ Liver failure:	
hepatic artery thrombosis	11
<i><u>primary non function</u></i>	9
sever rejection	5
◆ Infection	21
◆ Bleeding	7
◆ Miscellaneous	8
	<hr/>
	61

Adapté de Khan et coll. (1989)

L'incidence du non-fonctionnement primaire après une transplantation hépatique est d'environ 10% (Ploeg et coll., 1993 ; Strasberg et coll., 1994 ; Jaeschke, 1996). Parmi les facteurs de risques impliqués, on note l'âge du donneur et le temps de préservation à froid (Tableau IV). Un âge supérieur à 50 ans est un risque relatif (Strasberg et coll., 1994). Ce point est difficile à améliorer (par manque de jeunes donneurs d'organes). D'autres part, un temps de préservation supérieur à 30 heures représente un risque absolu, alors qu'un temps supérieur à 12 heures représente un risque relatif de dysfonctionnement primaire. C'est pour cette raison qu'en clinique, on n'excède jamais 12 heures de préservation à froid de l'organe destiné à être transplanter. Or, 12 heures est un temps limite aussi bien pour le transport de l'organe entre les centres de transplantations que pour les équipes chirurgicales. En effet ces derniers prélèvent l'organe chez le donneur (cela prend en moyenne 8-12 heures de travail), et 8 heures plus tard la même équipe se retrouve souvent au bloc opératoire pour la mise en place de l'organe chez le receveur. Donc le temps de préservation à froid joue un rôle primordial dans le succès de la transplantation hépatique. Il est concevable de prolonger ce temps d'ischémie froide des organes à transplanter sans dégrader leur valeur fonctionnelle en améliorant la composition des solutions de préservation.

1.4. ISCHÉMIE ET TRANSPLANTATION HÉPATIQUE

Lors de la transplantation hépatique il y a deux périodes d'ischémie :

- ♦ **Ischémie chaude** : L'organe n'est plus perfusé par le sang du donneur, mais pas encore refroidie. C'est une période mal tolérée qui ne doit pas dépasser quelques minutes.

Tableau IV

Les facteurs de risques absolus et relatifs de rejet de greffe suite
à une transplantation hépatique

**Absolute and relative risk factors with proven or probable
relationship to outcome after orthotopic liver transplantation**

Risk factors by group	Relative risk factor	Absolute risk factor
Donor		
<u>Cold preservation time (UW)</u>	12 hr	30 hr
Fat in liver biopsy (weight 100 kg)	30%	60%
Age	50 yr	
Perioperative		
Warm ischemic time (min)	90	150
Recipient		
retransplantation	Y	N
medical status	Y	N
renal insufficiency in recipient	Y	N

Adapté de Strasberg et coll. (1994)

- ◆ **Ischémie froide** : Après le lavage et le refroidissement de l'organe, jusqu'à la reperfusion chez le receveur.

1.4.1. Définition

L'ischémie est un arrêt localisé de la circulation sanguine, qui peut être aigu, total ou chronique et incomplet. L'arrêt circulatoire provoque dans les tissus un défaut d'apports nutritifs et d'oxygène (Figure 1.7) qui entraîne une mort tissulaire d'autant plus rapide que l'organe touché est plus hautement spécialisé (ex : le foie).

1.4.2. Effet de l'ischémie sur les cellules parenchymateuses :

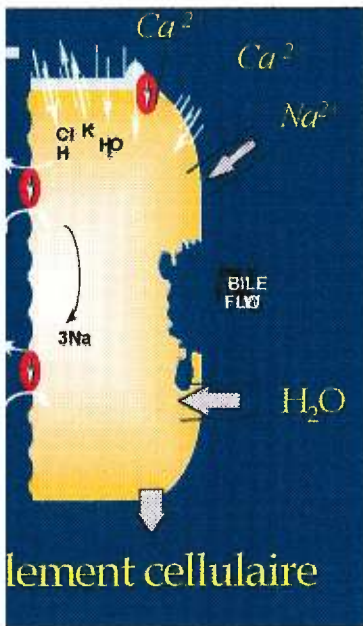
1.4.2.a. Ischémie chaude :

L'interruption sanguine d'un organe à 37°C entraîne la nécrose rapide des cellules qui le constituent. En effet, le manque de substrats énergétiques (ATP) entraîne un blocage de la pompe à sodium (Na^+/K^+ -ATPase). En situation normale, Celle-ci catalyse le passage du K^+ à l'intérieur de la cellule et du Na^+ à l'extérieur. Ceci contribue à établir un potentiel de membrane qui dépend surtout du gradient d'ions K^+ . En situation d'ischémie, le K^+ sort préférentiellement de la cellule et entraîne alors une chute du potentiel de la membrane. Pour maintenir la neutralité électrique, le Na^+ pénètre dans la cellule en compagnie d'anions chlore. De plus la concentration en Ca^{+2} intracellulaire augmente suite à un relargage du Ca^{+2} des organelles intracellulaires (par exemple les mitochondries), à une augmentation de la perméabilité membranaire et à la diminution

Figure 1.7

Effet de l'ischémie chaude et froide sur les cellules parenchymateuses

ISCHÉMIE CHAUDE



	Ischémie chaude	Ischémie froide
Temperature ° C	37	4
Besoin énergétique (%)	100	5
Activité métabolique(%) (glycolyse anaérobie)	100	5-10
Gonflement cellulaire	+	+
acide lactique	+	+
pH	↓	↓
radicaux libres (reperfusion, O ₂)	+	+

de l'activité de la Ca^{2+} ATP-ase (Arnold et coll., 1986 ; Brezis et coll., 1984 ; Masson et Beck, 1981 ; Weinberg, 1986 ; Cheung et coll., 1986 ; Rosser et Gores, 1995). Les conséquences de tous ces événements cellulaires sont que l'osmolarité intracellulaire augmente et par conséquent l'eau pénètre à l'intérieur de la cellule. Ce phénomène provoque alors un gonflement et un œdème cellulaire ainsi que des dommages membranaires.

Le métabolisme du glucose est modifié. Il ne peut plus suivre la voie hautement énergétique de la glycolyse aérobie qui mène à l'acétyl CoA intégré au cycle de Krebs d'où sortent à chaque révolution des électrons réducteurs (sous forme de NADH_2) qui permettent les phosphorylations oxydantes au niveau des chaînes respiratoires mitochondriales. Ainsi est normalement régénéré l'ATP, principal carburant de la cellule. Lors de l'interruption vasculaire, le métabolisme s'oriente plutôt vers la glycolyse anaérobie, génératrice de l'acidification du milieu intracellulaire. Les membranes lysosomiales se rompent, les enzymes lytiques ainsi libérées vont détruire les cellules.

Au moment de la reperfusion, il y a transformation de l'oxygène en radicaux libres de types peroxyde et superoxyde, hautement toxiques pour les membranes cellulaires. La conséquence de ces radicaux est la destruction des membranes plasmiques et intracellulaires (Hansson et coll., 1983).

En résumé les principaux événements cellulaires impliqués dans cette phase sont les suivants :

- Disparition de l'oxygène et passage à un métabolisme anaérobie.
- Diminution rapide des substrats énergétique (ATP-adénosine triphosphate).
- Absence d'élimination de composants métaboliques néfastes.

La conséquence immédiate de ces événements cellulaires est la perte de l'homéostasie intracellulaire électrolytique et l'œdème cellulaire.

1.4.2.b. Ischémie froide :

La clé de la préservation des organes et la prévention des conséquences de l'ischémie, c'est l'hypothermie. Depuis 60 ans, il est notoire que la diminution de la température est le moyen le plus efficace pour protéger un organe d'une agression ischémique. L'efficacité de l'hypothermie peut être mise en relation avec la diminution de l'activité métabolique (réactions métaboliques diminuées de 90 à 95%) (Brown et Brengelmann, 1965). On observe aussi une réduction des besoins énergétiques. Par exemple, à 5°C, les besoins en O₂ ne représentent plus que 5% de leur niveau à 37°C. La chute du pH (acidose) et la formation de produits toxiques comme l'acide lactique qui font partie du tableau de l'ischémie chaude se retrouvent également en hypothermie (Southard et Belzer, 1989).

Les mitochondries jouent un rôle majeur dans la génération du métabolisme énergétique en milieu aérobie, et l'ischémie chaude provoque une disparition brutale de l'activité mitochondriale. Par contre, en ischémie froide, des mitochondries prélevées sur des reins perfusés pendant 5 jours ou des foies pendant 2-3 jours sont capables de récupérer leur capacité de régénérer de l'ATP après reperfusion (Kim et coll., 1992). Dès lors, on peut penser qu'un des bénéfices majeurs de l'hypothermie est de préserver la fonction des mitochondries (Besse et coll., 1989 ; Rosser et Gores, 1995). Par contre, une des limites de l'hypothermie serait plutôt liée aux dégâts membranaires du gonflement

cellulaire. Cet œdème peut être atténué par l'utilisation d'osmolytes imperméants généralement utilisés dans différentes solutions de préservations.

1.4.3. Effet de l'ischémie sur les cellules endothéliales et les cellules de Küpffer

L'endothélium vasculaire est très sensible aux stress ischémiques et à la reperfusion. Ses lésions ont des conséquences immédiates sur l'hépatocyte. L'importance de l'endothélium a été mentionnée par Bess et coll. (1989). Ce dernier a observé une survie prolongée après ischémie chaude chez le rat (105 minutes) grâce à l'inhibition de production de la thromboxane A₂. Les cellules endothéliales en culture peuvent produire des superoxydes et des radicaux libres hydroxyles après une anoxie et une réoxygénation (Zweier et coll., 1988 ; Nunes et coll., 1995). De même, des peroxydes extracellulaires peuvent entrer dans les cellules endothéliales et interagir avec le fer pour former des radicaux hydroxyles hautement réactifs (Kvietys et coll., 1992). De plus plusieurs médiateurs produits par le leucocyte, activés par les cellules de Küpffer, les plaquettes sanguines ou les cellules endothéliales, pourraient jouer un rôle important dans les lésions post ischémiques du foie (Calwell-Kenkel et coll., 1991). Il a été démontré que la reperfusion hépatique après une ischémie froide, active les cellules de Küpffer qui produisent alors des cytokines inflammatoires comme l'interleukine I ou le Tumeur Necrosis Factors (TNF) (Rao et coll., 1991 ; Imamura et coll., 1995).

1.4.4. Effet de l'ischémie sur le système relié au cytochrome P-450

La non-fonction primaire du greffon est caractérisée, entre autres, par une défail-

lance hépatocellulaire avec réduction du débit de la bile, et du métabolisme hépatique des médicaments (Oakland et coll., 1989 ; Nagel et coll., 1989). Pour estimer la viabilité et prédire le pronostic du patient après une transplantation hépatique, plusieurs études ont suggéré que l'habilité du foie à métaboliser des médicaments puisse être utilisée comme indicateur fonctionnel du greffon après une transplantation hépatique *in vivo* (Barbier et coll., 1997). Certains auteurs ont suggéré que la diminution du métabolisme des médicaments soit en rapport avec le débit du sang hépatique et l'activité du cytochrome P-450 reliés aux microsomes du foie (Zysset, 1986). Cependant, la diminution du débit entraîne une hypoxie, ce qui va entraîner une dégénérescence de la structure du cytochrome P-450 (Srivastava et coll., 1980). Une étude récente a démontré qu'une préservation dans la solution U.W. entraîne une détérioration du système cytochrome P-450 et une perte du métabolisme et de la détoxification des xénobiotiques (Izuishi et coll., 1996).

D'autre part, il a été démontré clairement que l'ischémie à froid suivie d'une reperfusion à chaud accélèrent la dégradation des phospholipides membranaires causée par l'augmentation du Ca^{2+} et subséquemment par l'activation de la phospholipase A2 intrinsèque (Chien et coll., 1978 ; Harrison et coll., 1991). De même Hamamoto et coll. (1993) ont observé une relâche des acides gras libres par le foie, après une ischémie froide supérieure à 48 heures dans la solution U.W. suivie de reperfusion chaude. Par ailleurs, la phosphatidylcholine est un important stabilisant du système cytochrome P-450 et de son activité (Strobel et coll., 1970). Donc, le changement de la composition de phospholipides suite à une ischémie froide entraîne une perturbation de la membrane microsomale, une

instabilité du système cytochrome P-450 (Hamamoto et coll., 1989) et une accélération de la dégradation des composantes dudit système. Les substances réagissant avec l'oxygène, produites par l'ischémie froide suivie de réchauffement, induisent une peroxydation des lipides (Younes et Strubelt, 1988). Finalement, cette cascade de réactions provoque une activation des plaquettes (Mc Intyre et coll., 1986) et une infiltration des neutrophiles (Jaeschke et coll., 1990). Par conséquent, la coagulation intrasinusoidale est augmentée (Ogawa et coll., 1990), ce qui va causer une hypoperfusion des tissus, et donc une dégénérescence du cytochrome P-450.

1.5. SOLUTION DE PRÉSERVATION

Différentes solutions de préservation ont été développées pour réduire les conséquences de l'ischémie et permettre la transplantation d'organes de bonne qualité fonctionnelle.

1.5.1. Objectifs de l'utilisation des solutions de préservation

1.5.1.a. Au niveau clinique

Le but principal de la conservation d'organes est de maintenir la viabilité des différents organes pour une période suffisante à l'accomplissement d'un certain nombre de gestes cliniques :

- Détermination de groupes sanguins ABO et tissulaire HLA qui représentent la base de compatibilité entre donneur et receveur.
- Transport d'organes entre différents centres de transplantation.

1.5.1.b. Au niveau fondamental

- Réduire l'œdème de la cellule en rétablissant une pression osmotique extracellulaire.
- Prévenir l'acidité intracellulaire.
- Limiter l'expansion de l'espace interstitiel au moment de la perfusion de l'organe, ce qui pourrait comprimer le système sinusoidal et entrave la bonne perfusion de la solution.
- Limiter les lésions de la reperfusion dues aux radicaux libres accumulés dans l'organe pendant sa conservation.

1.5.2. Différentes étapes de l'évolution des solutions de préservations (Tableau V).

1.5.2.a. Solution Euro-Collins (EC)

En 1969, Collins a reconnu le rôle joué par l'œdème cellulaire dans la conservation d'organes. Pour prévenir ce gonflement et supprimer l'efflux de K^+ intracellulaire induit par l'hypothermie, Collins a augmenté la concentration des solutés imperméants (glucose 130 mM) et la concentration du K^+ (115 mM) et a diminué celle du sodium (10 mM). La composition de cette solution ressemble au milieu cytoplasmique (Collins et coll., 1969).

Tableau VDifférentes étapes de l'évolution des solutions de préservation

Solution de préservation	Année Type de foie	Temps de Préservation	NFP
Solution Euro-collins (EC)	1967 (homme)	6-8 hr	80-90%
Solution de l'Univ. de Wisconsin (UW)	1987 (homme)	12-24 hr	5-20%
Sol. sodium lactobionate sucrose (SLS)	1990 (rat)	20 hr	?

NFP : non-fonction primaire

1.5.2.b. Solution de l'Université de Wisconsin (U.W.)

En 1987, Belzer, s'appuyant sur 20 ans de recherches dans le domaine de la préservation d'organes et sur les connaissances actuelles de la physiopathologie de l'ischémie, a alors mis au point une nouvelle solution de préservation à l'Université de Wisconsin (U.W.) en collaboration avec Southard et Blezer (1993).

Parmi les constituants de cette solution (Tableau VI) :

- Acide lactobionique, anion organique qui semble supérieur aux phosphates ou aux sulfates pour empêcher le gonflement cellulaire. Cet anion a également la propriété de chélater le fer et de diminuer ainsi les radicaux hydroxyles hautement réactifs.
- Raffinose, trisaccharide qui est un sucre moins perméant que le glucose et le sucrose.
- Adénosine qui en combinaison avec les phosphates permet non seulement d'augmenter la concentration de l'ATP durant la préservation mais également de stimuler sa synthèse durant la reperfusion.
- Hydroxyéthyl amidon (HES), un polymère de glucose de grand poids moléculaire (250000) qui est destiné à maintenir la pression oncotique.
- Glutathion qui supprime la sortie de l'ATP de la cellule et possède une activité antioxydante.
- L'allopurinol piègeurs de radicaux libres, antioxydant et inhibiteur de la xanthine-oxydase.

Tableau VI

Composition de deux solutions de préservation: la solution de l'Université de Wisconsin (U.W.) et la solution sodium-lactobionate-sucrose (SLS)

COMPOSITION	UW*	SLS*	FONCTIONS
lactobionate ⁻	100	100	→ lutte contre le gonflement cellulaire
lactose	30	—	
sucrose	—	75	
K ⁺	125	5	→ tamponne l'acidité intracellulaire
Mg ²⁺	5	5	
O ₄ ²⁻	5	5	
O ₄ ²⁻	25	25	→ antioxydant, ↓ sortie ATP
Na ⁺	25	155	
glutathion	3	3	
allopurinol	1	—	→ inhibiteur de la xanthine oxydase
adénosine	5	—	→ ↑ATP:
hydroxyléthyl d'amidon	50	—	→ maintient pression oncotique
insuline	100 U/L	—	
penicilline	250.000 U	—	
dexaméthasone	8 mg	—	
osmolalité (mOsm/L)	325	370	
pH	7.4	7.4	

Valeurs en mmols/L, sauf où indiqué.

La solution U.W. a complètement révolutionné le monde de la transplantation hépatique car les constituants qui la composent semblent particulièrement bien adaptés pour empêcher l'œdème intracellulaire et par conséquent, permettre la survie des cellules hépatiques. En effet, des durées de conservation allant jusqu'à 48 heures chez le chien et 24 heures chez le rat, ont été rapportées comme étant des succès. Les premières études humaines montrent la très nette supériorité de cette solution. Les greffes hépatiques sont réalisées avec succès après une ischémie froide de 12 à 20 heures. Ferguson et coll. (1991) ont démontré l'effet bénéfique de la U.W. puisque cette solution, en comparaison avec la solution Collins, semble diminuer la peroxydation lipidique. En effet, la formation de malondialdéhyde (MDA) est semblable pour les deux solutions après une ischémie froide. Par contre, la concentration de MDA augmente significativement plus dans le groupe préservé dans la solution de Collins que dans celui préservé 4 heures dans la solution U.W. après la reperfusion. De même, les lésions histologiques sont moindres pour les rats perfusés avec la solution U.W..

Ces études ont montré le pouvoir antioxydant de la solution U.W. grâce aux additifs précités (allopurinol, glutathion, lactobionate). Néanmoins, d'autres études ne vont pas tout à fait dans le même sens, et certains auteurs ont supprimé chacun de ces derniers constituants de la solution U.W., apparemment sans effet néfaste (Southard et coll., 1990 ; Yu et coll., 1989 ; Sumimoto et coll., 1989). En effet, le stress oxydant et la formation des radicaux libres consécutifs à l'ischémie hépatique ne sont pas seulement dus à la production de xanthine oxydase, mais aussi aux dommages mitochondriaux et à l'activation des leucocytes, des cellules de Kupffer ou de l'endothélium lui-même. De

plus la peroxydation lipidique au niveau des hépatocytes peut être minimale, car ils contiennent une grande concentration de glutathion et de superoxyde dismutase qui sont des composés antioxydants et constituent donc un mécanisme de défense naturel.

1.5.2.c. Modifications de la solution U.W.

La composition des solutions de préservation d'organes joue un rôle critique dans la qualité et le temps de préservation. Les travaux de recherche dans le domaine de la préservation d'organes continuent à chercher l'agent idéal ou la combinaison d'agents à inclure dans la solution de préservation pour optimiser ses capacités de préservation. Cependant le développement de n'importe quelle solution de préservation d'organes demande de raffiner la composition de base pour la rendre plus facile à utiliser, à diminuer le coût, et surtout à prolonger le temps de préservation des organes.

1.5.2.c.i. La solution U.W. sans Hydroxyéthyl amidon (HES)

Les premières tentatives pour simplifier la solution U.W. étaient de comprendre quelles composantes étaient importantes pour la préservation d'organes. Certaines études ont recherché le rôle du HES dans la préservation. Il semble que pour des préservations à court terme du foie, le HES n'est pas nécessaire pour la survie du greffon. Cette solution a été utilisée pour des préservations cliniques lors de la transplantation du foie. Aucune différence de fonction de greffon n'a été observée entre les deux groupes (U.W.-HES) lors d'une préservation d'une durée de 15 heures (Jamieson et coll., 1990 ; Jamieson, 1989).

1.5.2.c.ii. La solution Histidine-Lactobionate (HL)

Sumimoto et son équipe (Sumimoto et coll., 1991 ; Sumimoto et coll., 1992) ont modifié la solution U.W. en utilisant le cation histidine à la place du potassium. La solution HL contient 90 mM de sodium lactobionate, 90 mM de l'Histidine, 20 mM de phosphate, 25 mM de raffinose, 5mM de magnésium, 3mM de glutathion, et 1mM d'allopurinol. L'histidine a été utilisée en clinique pour la transplantation cardiaque et elle a été appliquée à la préservation du foie pour de courtes durées (Groenewoud et coll., 1989). L'effet bénéfique de cet acide aminé peut être dû au retard du gonflement cellulaire induit par l'hypothermie.

1.5.2.c.iii. La solution Sodium Lactobionate Sucrose (SLS)

Une autre modification développée par Collins et coll. (1993), est la solution SLS. Cette solution a des caractéristiques similaires au tampon Phosphate Buffered Sucrose (PBS), qui est relativement efficace pour le rein (Lodge et coll., 1991). La solution SLS utilise de haute concentration de lactobionate au lieu du phosphate comme cela est le cas dans le PBS. La solution contient 100 mM de lactobionate, 3mM de glutathion, 75 mM de sucrose, 25 mM de phosphate, 155 mM de Na⁺ et 5 mM de K⁺. Le pH est 7.4 et l'osmolarité est de 370 mOsmol/L (Tableau VI). La solution SLS a permis une préservation de 20 heures du foie de rat (Tokunaga et coll., 1991). Cette solution semble aussi être équivalente à la solution U.W. pour le foie et à la solution Collins pour le rein. Il a été montré que la composante la plus importante de la solution est le lactobionate qui est un élément imperméant, supprimant le gonflement cellulaire dû à l'hypothermie. Il a été suggéré que la faible concentration de K⁺ dans la solution SLS soit aussi un avantage,

car il semble minimiser le besoin de rinçage de l'organe pour prévenir les dommages qui pourraient causer l'hyperkaliémie lors de la reperfusion (Collins et Wicomb, 1992 ; Southard et Belzer, 1993).

1.6. HYPOTHÈSE DE L'ÉCHEC DE LA TRANSPLANTATION HÉPATIQUE

Les cellules les plus susceptibles à l'ischémie - reperfusion du foie sont, dans l'ordre, les cellules endothéliales, les cellules de Küpffer et les cellules parenchymateuses ou hépatocytes. Parmi les hypothèses émises proposant des mécanismes qui engendrent la cytotoxicité hépatique (Figure 1.8), et donc l'échec de la transplantation, nous retenons la génération des radicaux libres (Zweier et coll., 1988 ; De Groot et Brecht, 1991 ; Nunes et coll., 1996), ainsi que les perturbations du calcium (Zweier et coll., 1988), du pH (Fuller et coll., 1988), du volume hépatocellulaire (Marsh et coll., 1989) et du métabolisme des xénobiotiques (Izuishi et coll., 1996). Notre étude s'intéresse particulièrement à élucider les phénomènes physiopathologiques associés aux perturbations du volume hépatocellulaire et du métabolisme des médicaments.

1.7. APPROCHE ET BUT DU TRAVAIL

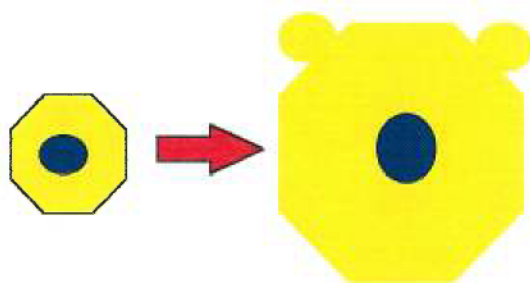
Le présent projet vise à élucider l'impact de l'hypothermie anoxique et du réchauffement subséquent sur l'homéostasie ionique, en particulier sur les mécanismes de transport membranaire impliqués dans le maintien d'un volume cellulaire normal stable, et sur l'activité métabolique du foie. Par ailleurs, un second objectif vise à comparer deux solutions de préservation la U.W. et la SLS, dans le but d'améliorer leur composition, car il y a encore un sérieux besoin d'augmenter la durée et la qualité de préservation d'organes pour

Figure 1.8

Hypothèse de l'échec de la transplantation hépatique

Hépatocyte

Cytotoxicité hépatique



GONFLEMENT CELLULAIRE

Génération des radicaux libres

Perturbation:

- Ca^{2+}
- pH
- volume cellulaire
- métabolisme (médicaments)

optimiser la transplantation hépatique et minimiser l'incidence de la non-fonction primaire.

En premier lieu nous avons étudié l'effet du milieu de préservation à froid (solution U.W.), du temps de l'hypoxie (0, 10, 24, 48, 72 heures) et des solutions de réchauffement (milieu de culture, tampon Krebs-Henseleit ou HEPES) sur les mécanismes de régulation du volume cellulaire et sur le gonflement cellulaire induit par l'accumulation des acides aminés. Ensuite, nous avons comparé l'influence de deux solutions de préservation (U.W. et SLS) sur l'accumulation des acides aminés, et sur le métabolisme de la théophylline en fonction du temps de préservation (0, 4, 10, 24, 48 heures).

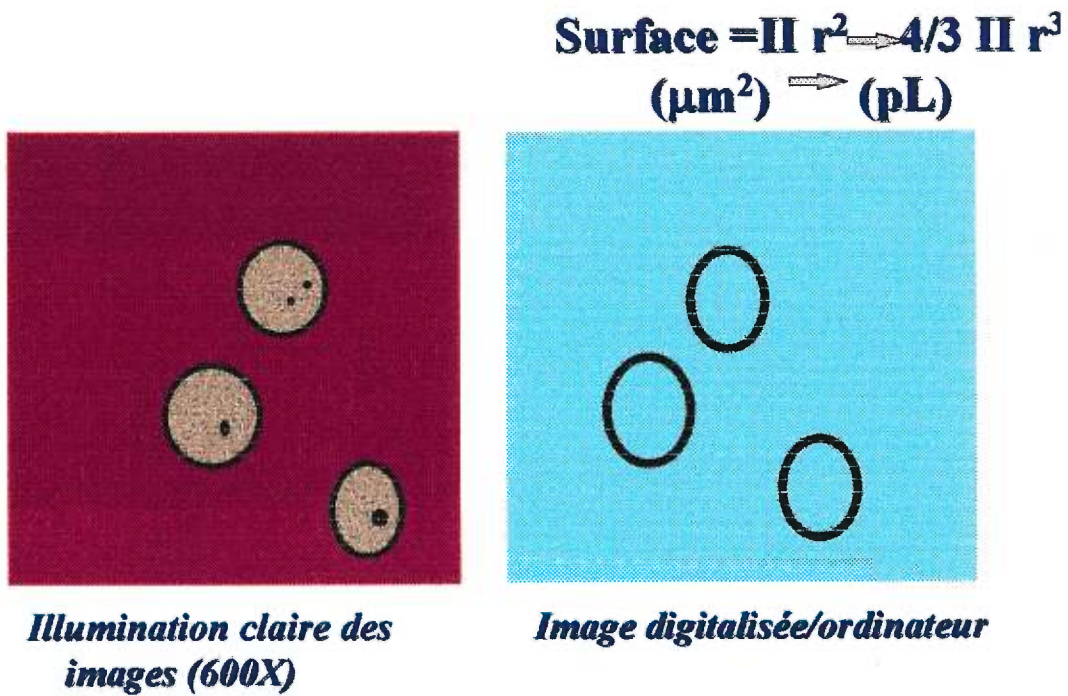
Pour ce faire nous avons mis au point un modèle *in vitro* afin de mimer les conditions *in vivo* de la préservation à froid et du réchauffement lors de la transplantation hépatique. Nous avons utilisé un modèle d'hépatocytes isolés par perfusion du foie de rat à la collagénase. Les hépatocytes sont purifiés par centrifugation sur un gradient de Percoll. Ces cellules isolées du foie sont préservées dans différentes conditions. Elles sont maintenues à 4°C de 0-72 heures (0, 4, 10, 24, 48 et 72 h) dans la solution U.W. ou la SLS. Ensuite ces cellules sont incubées à 37° C de 1 à 2 heures sur des lamelles recouvertes de Matrigel. Ce modèle procure une situation moins complexe que l'organe entier puisque les cellules ne subissent pas les influences hormonales, ni les phénomènes d'interaction cellulaire. Il permet ainsi, d'étudier l'homéostasie ionique des hépatocytes dans des conditions bien contrôlées.

Le volume cellulaire est mesuré par la technique de vidéoplanimétrie à l'aide d'un système optique et informatique d'analyse d'images. Des images obtenues en champ ouvert sur un microscope inversé sont captées par une caméra compteuse de photons dont le

contraste est ajusté pour obtenir une différence prononcée entre le contour cellulaire (noir) et le fond du bain (blanc). Ces images sont digitalisées et sauvegardées sur le disque dur d'un ordinateur. Les images sont analysées ensuite à l'aide d'un logiciel (Profile) qui permet de mesurer la surface sectionnelle des hépatocytes isolés choisis dans le champ (Figure 1.9). Le volume cellulaire est calculé à partir de cette surface circulaire par l'équation géométrique simple qui la relie au volume d'une sphère. Cette méthode permet une haute résolution spatiale et temporelle (jusqu'à 1/30 de seconde). Nous avons profité de la vitesse et de la précision de la vidéoplanimétrie à mesurer le volume cellulaire, pour suivre l'accumulation des acides aminés l'AIB, la glutamine et la proline dans les hépatocytes, qui reflète l'activité des systèmes A, ASC et N respectivement. Ceci a permis d'évaluer l'impact de la préservation à froid et du réchauffement sur le gonflement induit par l'accumulation des acides aminés. Le principe de cette méthode est que l'entrée initiale des acides aminés sera instantanément suivie d'un mouvement d'eau osmotique. De plus la période du temps initial qui est d'une minute, durant laquelle la vitesse du changement du volume est mesurée, est beaucoup moins influencée par le métabolisme ou par les mécanismes de la régulation du volume beaucoup plus tardifs.

Figure 1.9

Techniques de mesure du volume hépatocellulaire par la technique de vidéoplanimétrie



CHAPITRE 2

***EFFECTS OF COLD PRESERVATION AND REWARMING
ON RAT LIVER CELL
VOLUME REGULATION AND
CONCENTRATIVE AMINO ACID UPTAKE***

Par

Halima SERRAR et Pierre HADDAD

Publié en 1995 dans

GASTROENTEROLOGY. 112 : 1344-1353

**EFFECTS OF COLD PRESERVATION AND REWARMING
ON RAT LIVER CELL VOLUME REGULATION AND
CONCENTRATIVE AMINO ACID UPTAKE**

Short title : Hepatocyte cold storage and volume regulation

Halima SERRAR and Pierre HADDAD

Groupe de recherche en transport membranaire et
Département de pharmacologie,
Université de Montréal, Montréal (Québec), CANADA

Grant support

These studies were supported by a program grant from the Medical Research Council of Canada (Grant PG-11118). Part of these studies formed the basis of an undergraduate project carried out by Jean-François LANDRÉ and financed by a summer studentship from the Canadian Liver Foundation. Halima SERRAR is the recipient of a Ph.D. studentship from the Groupe de Recherche en Transport Membranaire, made possible by grants from the Quebec Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) and from the Université de Montréal. Pierre HADDAD is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

Abbreviations

U.W., University of Wisconsin ; KHB, Krebs-Henseleit buffer ;
RVD, regulatory volume decrease ; RVI, regulatory volume increase ;
AIB, α -aminobutyric acid ; ANOVA, analysis of variance ;
HEPES, 4-(2-hydroxy-ethyl)-1-piperazine-ethane sulfonic acid.

Address correspondence to :

Pierre HADDAD, Ph. D.

Groupe de Recherche en Transport Membranaire and

Département de pharmacologie

Université de Montréal

P.O. Box 6128, Downtown Station

Montréal (Québec)

CANADA H3C 3J7

Telephone : (514) 343-6590

FAX : (514) 343-2291

E-mail :



ABSTRACT

Background : Liver graft dysfunction is related to prolonged hypothermic preservation and may implicate altered cell volume homeostasis.

Aim : To evaluate the impact of cold preservation and rewarming on liver cell volume regulatory mechanisms and concentrative amino acid uptake, isolated rat hepatocytes were suspended for variable times in cold University of Wisconsin solution and subsequently cultured at 37°C.

Methods : Cell viability was assessed by Trypan Blue exclusion. Cell volume was measured by videoplanimetric analysis of bright-field microscopic images to study the response to a 10-min 75 mOsm hypotonic stress. Concentrative amino acid uptake was assessed by measuring Na⁺-dependent cell swelling induced by amino-isobutyric acid, proline and glutamine.

Results : Cell viability decreased slightly but significantly as a function of cold storage time even as early as 4 hours. Upon hypotonic stress, cells swelled from a similar baseline volume to an equivalent extent irrespective of preservation time. However, the rate of subsequent regulatory volume decrease diminished constantly and significantly as a function of cold preservation time on. Upon return to isotonic perfusate, cells shrunk to a similar extent, but the rate of subsequent regulatory volume increase was halved by cold storage beyond 24 hours. The rate of proline-induced cell swelling was greatly diminished after cold storage whereas that induced by amino-isobutyric acid and glutamine remained normal for preservation times of up to 48 hours.

Conclusion : The results suggest that hepatocellular volume regulatory mechanisms and concentrative proline uptake are significantly impaired after cold preservation and rewarming, while AIB and glutamine uptake are more resistant. These conditions can favour chronic cell swelling after transplantation and may participate in liver graft dysfunction.

INTRODUCTION

The transplantation of a healthy liver to replace a diseased or functionally destroyed one is a therapeutic act which has been increasingly practised in the last 10 years. However, post-operative graft failure remains unreasonably high¹. Clinical studies have demonstrated that 15% of deaths after a liver transplant are due to primary dysfunction or non-function^{1,2}. Independently of all pre- and post-operative problems, these failures can be attributed, in great part, to the damages caused by cold preservation and subsequent warm reperfusion of the grafted liver¹. Among the hypotheses concerning the cellular mechanisms underlying such hepatic dysfunction, the most important are free radical production^{3,4} and disturbances in the homeostasis of intracellular calcium⁵, pH^{6,7}, and cellular volume⁸.

Cell volume regulation is a particularly important element since cold preservation, by inhibiting Na⁺/K⁺-ATPase activity, is known to induce ion redistribution and cell swelling in the liver⁹. Exaggerated increases in cell volume can, in turn, rupture the plasma membrane and severely compromise the viability of hepatocytes as evidenced *in vitro* by the leakage of cytosolic enzymes such as lactate dehydrogenase (LDH)⁸ and *in vivo* by elevated serum transaminases of hepatic origin¹⁰. Hence, preservation solutions such as that elaborated by Belzer and colleagues at the University of Wisconsin (U.W. solution) were developed, in part, to limit cold-induced swelling¹¹. Indeed, compared with Euro-Collins solution, U.W. solution "markedly reduced parenchymal cell blebbing and swelling before reperfusion" as assessed by morphological criteria in the isolated perfused rat liver¹². However, others have shown that liver cell metabolism is significantly altered by cold preservation in U.W. solution¹³. In recent years, it has also become evident that cell volume changes, within the physiological realm, can exert a profound influence on hepatic

metabolism¹⁴. Thus, despite the prevention of cell swelling during cold preservation in U.W. solution, it remains possible that cell volume perturbations may occur after reperfusion and could participate in initial liver graft dysfunction. Indeed, the effects of cold preservation and rewarming on liver cell volume regulatory mechanisms have, to date, not been evaluated.

Like all eukaryotic cells studied to date, liver cells challenged with swelling stimuli, such as hypotonic stress, exhibit compensatory ion movements which result in regulatory volume decrease (RVD)¹⁵. In hepatocytes, RVD is mediated principally by increases in the conductance of K^+ and Cl^- ¹⁶⁻¹⁸. It is also accompanied by a decreased Na^+/H^+ exchange activity¹⁶ leading to intracellular acidification¹⁹. In contrast, as seen in lymphocytes²⁰ and Ehrlich ascites tumour cells²¹, regulatory volume increase (RVI) in rat liver cells is not observed after hypertonic stress, but only upon return to isotonicity after a period of hypotonicity¹⁷. Such RVI proceeds principally by activation of the Na^+/H^+ exchanger which secondarily stimulates Na^+/K^+ -ATPase^{16,22}. This is accompanied by a parallel activation of the Cl^-/HCO_3^- exchanger, and possibly of the $Na^+/K^+/2Cl^-$ cotransporter, as well as by a decrease in membrane K^+ conductance²³. Together, these events lead to a net accumulation of KCl and contribute to the return of cell volume toward normal.

Although very useful to study volume regulatory mechanisms, osmotic shocks are not physiological for the liver^{24,25}. On the other hand, amino acid accumulation corresponds to a real and physiological situation which induces an osmotic stress in hepatocytes. Indeed, many studies have demonstrated that concentrative uptake of amino acids can induce liver cell swelling²⁶⁻²⁸. Several Na^+ -coupled amino acid transport systems are expressed on the plasma membrane of liver cells and can contribute to this phenomenon. The most notable

are systems A and ASC for neutral amino acids and the liver-specific system N for glutamine, histidine and asparagine²⁹.

Because liver cell volume perturbations may underlie some of the deleterious effects of cold preservation and rewarming on hepatic function, and since concentrative amino acid uptake represents a physiologically-relevant osmotic stress for the liver, the aims of the present study were two-fold. Firstly, we examined the impact of cold preservation in U.W. solution and of subsequent rewarming on the regulatory volume response of isolated hepatocytes to hypotonic stress. Secondly, we verified the integrity of concentrative Na⁺-coupled amino acid uptake after cold storage and rewarming. We report that, as a function of cold preservation time, liver cells become progressively sluggish in responding to swelling (RVD) or shrinking (RVI) stimuli. Concentrative proline uptake is also very sensitive to cold storage whereas that of amino-isobutyric acid and of glutamine are well preserved for periods of up to 48 hours. These phenomena may contribute to the primary dysfunction of the grafted liver after transplantation.

MATERIALS AND METHODS

Cell Isolation, Preservation and short-term Culture

Animals used in this study were treated in accordance with the guidelines of the Canadian Council on the Care of Laboratory Animals and all experimental protocols were approved by the university ethics committee. Hepatocytes were isolated from the livers of fed male Sprague-Dawley rats weighing 150-200 g (Charles River, St-Constant, Quebec) by a variation of the classical collagenase perfusion as described previously³⁰. Hepatocytes were purified by centrifugation on a Percoll gradient and exhibited a viability of about 90%

as assessed by exclusion of Trypan blue. The cells were then suspended in U.W. solution and kept at 4°C for up to 72 hours. At 24 hr intervals, U.W. solution was aspirated and the preserved cells resuspended in cold Williams E medium for assessment of cell viability by exclusion of Trypan blue. Next, cells were diluted in warm bicarbonate-buffered Williams E medium ($7.5-8.5 \times 10^5$ cells/ml) and seeded onto round glass coverslips coated with Matrigel (Collaborative Research Biomedical Products, Bedford, MA). Preliminary studies confirmed that Matrigel allows the maintenance of spherical cellular shape as previously reported by others³¹ and that it is advantageous to the more fragile adherence to glass alone as used previously¹⁸. Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 95% O₂ - 5% CO₂ for 90 to 120 min prior to starting the experiments. In the last half-hour, medium was exchanged for Krebs-Henseleit solution buffered with either HEPES or bicarbonate, as described below, in order to allow equilibration of the cells with the perfusion conditions.

Experimental Solutions and Protocols

Coverslips with adhered cells were placed in a specially designed plastic bath (100 µl trough) set on the stage of an inverted microscope (Olympus IM-T2, Carsen Medical, Markham, Ontario). Cells were perfused at a flow rate of 2-3 ml/min. For the first series of experiments on the response to osmotic stress, we used a Krebs-Henseleit buffer (KHB) containing (in mM): 120 NaCl, 25 NaHCO₃, 5.5 D-glucose, 3.8 KCl, 1.8 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄ and 1 Na-pyruvate. Hypotonic stress was induced for a period of 10 min by administering a KHB solution where 40 mM NaCl was removed (decrease of 75 ± 4 from a control osmolality of 285 ± 18 mOsm/kg as measured by freezing-point depression on a model 3D2 osmometer from Advanced Instruments, Needham Heights, Massachusetts). Isotonicity was then re-established and experiments carried out for an additional 20 to 25 minutes. These

solutions were equilibrated at 37°C with 95% O₂ : 5% CO₂ in a thermostated waterbath and fed by gravity through CO₂-impermeable SARAN tubing (Pyramid Plastics, Arkansas).

For the second series of experiments on concentrative amino acid uptake, we used HEPES-buffered solutions equilibrated at 37°C in 100% O₂ and containing (in mM): 138 NaCl, 10 HEPES, 10 sucrose, 5.5 D-glucose, 3.8 KCl, 1.8 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄ and 1 Na-pyruvate (pH 7.4 with NaOH). α -amino-isobutyric acid (AIB), proline and glutamine served as typical and preferential substrates for Na⁺-coupled amino acid transport systems A, ASC and N respectively^{29,32}. Each amino acid was administered individually to separate coverslips at a concentration of 10 mM by iso-osmotic replacement of sucrose present in the control buffer. In order to establish the Na⁺ dependence of amino acid transport, identical parallel experiments were conducted using solutions where Na⁺ ions were iso-osmotically replaced by choline⁺. In all experiments, solutions were warmed prior to reaching the cells by using a homemade heating tube which kept bath temperature thermostated at 37±1°C.

Measurement of Cell Volume

Microscopic images (600X) of several single hepatocytes were obtained under bright field illumination with a DAGE-MTI CCD-72 camera (Intermetrix Systems, Mississauga, Ontario) adjusted to obtain a high contrast between the cell border and the surrounding background. Video images were digitalized using the IP-8 frame grabber (MATROX, Dorval, Quebec) and stored on the hard disk of an IBM-compatible personal computer (486 DX-66). Image acquisition and analysis was performed using a software developed in-house by the Groupe de Recherche en Transport Membranaire at the

Université de Montréal. Briefly, an algorithm was used to detect sharp changes in pixel intensity (cell border), to distinguish closed objects (images of cells whose borders were uninterrupted) and to calculate the pixel area of these objects (cross-sectional area of the cell). The system was calibrated using a standard micrometer and cell volume was calculated from the cross-sectional area using the simple geometric conversion to spherical shape as previously described and validated¹⁸.

Data analysis and statistics

Rates of RVD and RVI were calculated for each cell from the volume-versus-time curve over the first five minutes after maximal and minimal cell volumes were reached during hypotonic stress and after the return to isotonicity, respectively (see Figure 2.1).

Concentrative amino acid uptake was evaluated as the initial slope (first minute) of the rapid increase in cell volume observed upon administration of each amino acid. The Na⁺-dependent component was obtained by subtracting the average initial slope observed in several cells in choline media (not significantly different from 0) from the individual initial slopes obtained for each cell in Na⁺-containing buffer.

In both protocols, measurements were made in 5 to 12 cells at each preservation time for each preparation. Results were analysed by one-way ANOVA for repeated measures by comparing the average values of all determinations (cell replicates) at each preservation time for a given cell preparation. Results are presented as the mean \pm S.E. and N thus represents the number of cell preparations (animals) rather than the number of cells studied.

RESULTS

Cell viability and Morphological Integrity.

We evaluated the viability of liver cell suspensions at 24 hr intervals by the Trypan Blue exclusion test and found that it gradually and significantly diminished as a function of storage time in cold U.W. solution (Table VII). Subsequent short-term incubation at 37°C further diminished hepatocyte viability to levels 15 to 28 % lower than in the cold after 0 to 72 hours of preservation in U.W. solution. In an additional series of experiments, we also evaluated cell viability over shorter preservation times and found that it decreased slightly but significantly from $86.5 \pm 1.4\%$ in unstored controls to $80.3 \pm 1.4\%$ and $79.3 \pm 1.4\%$ after 4 and 10 hours in cold U.W. solution, respectively ($p < 0.05$ by paired ANOVA, $n = 6$). Subsequent rewarming for one hour at 37°C diminished these values to $66.2 \pm 0.9\%$, $58.3 \pm 1.1\%$ and $55.4 \pm 1.3\%$ for 0 (unstored control), 4 and 10 hours of cold storage respectively ($p < 0.05$ by paired ANOVA, $n = 6$). These results support the concept that cold storage and rewarming can independently affect liver cell viability^{8,12}.

We also obtained a qualitative measure of membrane integrity upon hypotonic stress. Indeed, our videoplanimetric method permits only the analysis of cells that maintain an intact border, free of ruptures (which prevent proper edge detection) or blebs (which induce large errors in relating circular area to spherical shape). As can be seen from Table VII, the proportion of cells that retained such morphological integrity in the face of hypotonic stress decreased gradually as a function of preservation time ($p = 0.031$ by Chi-square test). After 72 hours, more than 50 % of the cells developed blebs or membrane

rupture. Thus morphological integrity accurately reflects cell viability as assessed by Trypan Blue exclusion after cold preservation and rewarming.

Liver Cell Volume Regulation

The isolated hepatocytes that maintained an intact border responded to hypotonic stress by rapid swelling followed by a phase of regulatory volume decrease (RVD, Figure 1). Upon return to isotonic solutions after a 10 min period of hypotonic stress, cells rapidly shrank below their initial volume and exhibited regulatory volume increase (RVI) thereafter (Figure 2.1). This profile of hepatocellular volume changes is identical to the one previously observed by ourselves and others^{15,16,18,23}.

Figure 2.2 illustrates the effect of cold preservation in U.W. solution for variable time periods on RVD (panel A) and RVI (panel B) in cells cultured briefly at 37°C and challenged with a sudden 75 mOsm decrease in extracellular osmolarity for a period of 10 min. Steady-state hepatocyte volume (initial volume) had a tendency to decrease with preservation times beyond 24 hours but this effect did not reach statistical significance (N.S., Table VIII). Upon hypotonic stress, liver cells rapidly swelled to a maximum volume approximately 20 % above steady-state values irrespective of cold storage time (N.S., Table VIII). However, we observed that the initial rate of RVD gradually diminished as a function of cold storage time, this effect being statistically significant as early as 24 hours ($p = 0.021$ by ANOVA, Table VIII and Figure 2.2.A). By the end of the 10 min period of hypotonic stress, cell volume had recovered by approximately 50 % (as in Figure 2.1) in all groups. In an additional set of experiments, we found that shorter cold storage times did not modify the initial rate of RVD. Indeed, unstored control cells swelled by 23.0 ± 2.2 % above a baseline volume of 7.6 ± 0.4

pL and exhibited an initial RVD rate of $0.173 \pm 0.018 \text{ pL}\cdot\text{min}^{-1}$. In comparison, cells stored for 4 and 10 hours in cold U.W. solution swelled by $22.1 \pm 1.8 \%$ and $21.9 \pm 1.7 \%$ above baseline volumes of $7.3 \pm 0.3 \text{ pL}$ and $7.0 \pm 0.3 \text{ pL}$ and exhibited initial rates of RVD of 0.168 ± 0.001 and $0.165 \pm 0.017 \text{ pL}\cdot\text{min}^{-1}$, respectively ($p > 0.500$ by ANOVA, $n = 6$).

Upon the return to isotonicity, cell volume rapidly decreased (Figure 2.1) to a minimum value approximately 10 % below initial volume, once again, irrespectively of the period of cold preservation (N.S., Table IX). Nevertheless, the subsequent RVI proceeded at a significantly slower initial rate in cells which had previously been maintained for 48 and 72 hours in U.W. solution at 4°C ($p = 0.043$ by ANOVA, Table IX and Figure 2.2.B). As expected and assessed in additional experiments, cold preservation times shorter than 24 hours did not affect RVI. Indeed, unstored control cells shrunk to $92.4 \pm 1.2 \%$ of their initial volume and demonstrated an initial rate of RVI of $0.077 \pm 0.021 \text{ pL}\cdot\text{min}^{-1}$ ($n = 6$). Cells maintained for 4 and 10 hours in cold U.W. solution shrunk to $93.5 \pm 0.9 \%$ and $92.0 \pm 1.7\%$ of their initial volumes and exhibited RVI rates of 0.082 ± 0.014 and $0.078 \pm 0.016 \text{ pL}\cdot\text{min}^{-1}$, respectively ($p > 0.700$ by ANOVA, $n = 6$).

Concentrative Amino Acid Uptake

Figure 2.3 presents the hepatocellular volume changes induced by the sudden administration of 10 mM concentrations of either α -amino-isobutyric acid (AIB - panel A), proline (panel B) or glutamine (panel C) in the presence and absence of extracellular sodium ions. All amino acids induced a rapid increase in cell volume which reached a plateau within 5 to 10 minutes. Even after 15 minutes, cells remained swollen by $8.79 \pm 0.58 \%$, $8.26 \pm 2.01 \%$ and $8.45 \pm 0.35 \%$ above initial volume for AIB, proline and glutamine respectively

(results not illustrated). Replacement of extracellular Na^+ by choline⁺ completely prevented amino acid-induced cell swelling, indicating that the latter occurred as a result of Na^+ -coupled transport processes as expected^{25,29}.

Having thus confirmed the validity of volume measurements to follow concentrative amino acid uptake by isolated liver cells, we studied the effects of cold storage and rewarming on the cell swelling induced by AIB, proline and glutamine. As described in Table X, we observed that the initial rate of Na^+ -dependent cell swelling induced by proline was dramatically reduced as a function of cold preservation time, even after only 24 hours ($p= 0.030$ by ANOVA, Table X). In contrast, the Na^+ -dependent cell swelling induced by AIB and glutamine remained intact for up to 48 hours of preservation in U.W. solution as evidenced by similar initial rates of cell swelling (N.S., Table X). However, after 72 hours of preservation in cold U.W. solutions, deterioration of both AIB- and glutamine-induced cell swelling became evident. This is also reflected by the morphological integrity of the cells which is presented in Table XI. Indeed, for proline and glutamine, the number of cells that maintained an intact border, free of ruptures or blebs, was rather stable for the first 48 hours of cold preservation (N.S. by Chi-square test) and decreased more abruptly at 72 hours ($p= 0.006$ and $p < 0.001$ by Chi-square test, respectively). For AIB, morphological integrity decreased significantly from preservation times of 48 hours and on ($p = 0.002$ by Chi-square test).

DISCUSSION

For efficient transplantation, liver grafts need to be stored in the cold for the lengthy period that normally separates removal from the donor and placement in the host. So-called "transplantation injury" can occur as a result of this prolonged hypothermic storage, of the relatively brief warm hypoxia during surgery and of the subsequent warm reperfusion. Although preservation solutions have greatly enhanced graft survival and diminished cold-induced swelling, cold storage beyond 30 hours is considered as an absolute risk factor for poor transplantation prognosis¹. One of the major hypotheses brought forward to explain, at least in part, primary non-function or dysfunction of liver grafts concerns disturbed volume homeostasis^{8,33}. To date, however, no study had examined volume regulatory mechanisms in hepatic tissue submitted to cold preservation and rewarming. The primary aim of the present experiments was therefore to study liver volume regulation after cold storage and rewarming. We used isolated rat liver parenchymal cells suspended for variable time periods in cold U.W. solution and subsequently cultured for short periods in warm medium. As shown by the viability results, this *in vitro* model adequately mimicks the two phases of "transplantation injury" whereby part of the deterioration occurs during cold storage and another during rewarming¹². Although *in vitro* models based on isolated cells ultimately need to be validated by whole-organ and *in vivo* experiments, they offer an interesting tool to assess the function of the principal liver cell types in well-defined conditions. Indeed, several studies have used isolated rat hepatocytes to get detailed and specific information on the impact of "transplantation-like" conditions on hepatocyte functions^{13,34-36}.

Our results clearly demonstrate that cold storage in clinically relevant U.W. solution gradually impairs the capacity of liver parenchymal cells to cope with osmotically induced

swelling or shrinking stimuli. Morphologically, a significantly greater proportion of isolated hepatocytes exhibited membrane ruptures or blebs upon hypotonic challenge after cold storage. Even the morphologically intact (and hence more resistant) cells, however, displayed a significantly slower rate of RVD and of RVI after 24 and 48 hours of cold preservation and upon cell swelling by 20 % or cell shrinking by 10 %, respectively. This increasing sluggishness of volume regulatory mechanisms, as the period of hypothermia lengthens, can have significant physiological bearing on the maintenance of proper hepatocyte functions. Indeed, because of weaker volume regulatory mechanisms, liver cell volume could increase and remain elevated for lengthier periods in response to swelling stimuli which can occur when the grafted liver must face the sudden metabolic demands of the host.

Indeed, although extracellular osmotic shocks are not physiological for the liver²⁴, amino acid accumulation does correspond to a physiological situation which induces an osmotic stress for hepatocytes²⁵. Several studies have already shown that amino acids induce liver cell swelling^{25,27,28,37} and that this can have a profound influence on metabolic functions^{14,37,38}. The liver plays an important role in amino acid metabolism for which uptake is thought to be the rate limiting step^{29,32}. At least 8 largely differentiated amino acid transport systems have been characterised in liver cells on the basis of substrate specificity, Na⁺ dependency as well as adaptive and hormonal regulation²⁹. However, only the Na⁺-dependent transporters such as systems A^{32,39}, ASC^{32,40} and N^{32,41,42}, whose respective model substrates are AIB (a non-metabolizable analogue of alanine), proline and glutamine, are expected to lead to amino acid accumulation and hence to cell swelling.

We thus took advantage of the speed and precision of our videoplanimetric cell volume measurements to follow the cell swelling induced by concentrative uptake of AIB, glutamine and proline into hepatocytes as a function of cold storage time. The rationale of this method is that initial uptake of amino acids will be instantaneously followed by osmotic water movement. Our results clearly show that concentrative amino acid uptake provokes rapid cell swelling which is dependent on the presence of extracellular Na^+ . In addition, we have found that treatment of isolated hepatocytes for 30 min with 100 nM glucagon, one of the most potent hormonal stimulators of amino acid transport A^{29,39}, caused a greater than 4-fold increase in the swelling rate induced by AIB (Serrar and Haddad, unpublished observations). Taken together, these observations confirm the validity of using rapid and precise cell volume measurements to reflect concentrative amino acid uptake.

In this context, our results demonstrate that cold storage of hepatocytes in U.W. solution rapidly and dramatically impairs concentrative proline uptake which decreases by 50% after only 24 hours. Proline-induced cell swelling can thus be considered as a good marker of altered hepatocyte function after cold preservation and rewarming. This can find potential use in future studies aimed at improving preservation solutions. Although our results clearly suggest a decreased uptake rate for proline as a function of cold storage time, the physiological implication of ASC transport activity in this effect is difficult to assess since several substrates of this transporter can also be transported by other systems^{29,32}. More classical uptake studies with radiolabeled amino acids are necessary to address this point.

In contrast to proline uptake, that of AIB and glutamine remained normal for up to 48 hours of cold preservation, while 72 hours appears to be deleterious for all concentrative amino acid uptake mechanisms tested. This suggests that transport systems A and N, for which AIB and glutamine are preferential substrates, may be more resistant to cold preservation and rewarming than system ASC. This result, along with those on RVD and RVI, strongly indicates that cold storage and rewarming does not alter all hepatocellular functions to the same extent and with a similar time course.

The mechanisms which are responsible for the impairment of cell volume regulation observed after cold preservation and rewarming remain to be determined. However, in a parallel study on hepatocellular pH regulatory behaviour, we have found that Na^+/H^+ exchange activity was gradually and significantly depressed after cold storage and rewarming⁴³. Since this activity is involved in RVI mechanisms in liver cells^{16,22}, it may explain part of the decrease in RVI observed herein as a function of hypothermic preservation time.

On the other hand, our results obtained at time points earlier than 24 hours demonstrate that changes in cell viability precede those of cell volume regulation. This suggests that impaired volume regulation may not be the primary cause of cell death. One must bear in mind, as stated earlier, that the method of volume measurement inherently selects the most resistant cells (intact cell border) and, hence, probably underestimates the severity of volume regulatory disturbances. Moreover, the maintenance of efficient accumulation of AIB and glutamine, in conjunction with the observed impairment of

hepatocellular volume regulatory mechanisms after prolonged cold preservation, could place the liver graft in a precarious situation when circulation is established in the recipient.

Indeed, once it is transplanted, the liver graft suddenly has to face the metabolic demands of the host which include the concentrative uptake of circulating amino acids. This could lead to parenchymal cell swelling which we expect to be only sluggishly counteracted if the liver was stored in cold U.W. solution. Firstly, one must consider that the volume change induced by concentrative amino acid uptake reaches an average of approximately 8% above initial volume as compared to 20% with hypotonic stress. Consequently, RVD after amino acid-induced swelling is expected to be much slower than after hypotonic stress. This was previously shown for volume-regulatory K^+ efflux which become more important as cell-swelling increases¹⁵ (also compare Figures 1 in ref.¹⁶ and²⁷). In the present study, we observed a similar swollen state with each amino acid between 5 and 15 minutes after their administration, suggesting a slow rate of volume regulation. We also expect hepatocytes to remain swollen for progressively longer periods as a function of the time previously spent in cold U.W. solution since the initial rate of RVD gradually decreases. Although not necessarily cytochrome, such chronic cell volume changes (even of the order induced by amino acids) can exert a profound influence on hepatocellular metabolism^{14,37,38} and could thus seriously perturb hepatic function. The danger becomes especially relevant in the face of parenteral feeding that is sometimes instated clinically after the transplantation operation. Such iv solutions, like Hepatamine, contain high concentrations of amino acids such as alanine and glutamine whose concentrative uptake systems appear to be well preserved after cold storage and rewarming.

In conclusion, our studies demonstrate that hepatocytes hypothermically preserved in U.W. solution are less resistant to hypotonic stress and exhibit diminished rates of volume regulation from osmotically induced swollen or shrunken states. This may render such parenchymal cells more sluggish to respond to physiological swelling stimuli such as amino acid accumulation especially in the face of the metabolic demands of the graft recipient and of amino acid-rich parenteral feeding. The ensuing moderate but prolonged cell swelling can affect hepatocyte metabolic equilibrium. Our results thus bring valuable insight on hepatocyte volume regulatory functions after cold preservation and rewarming, and support the notion that alterations in cell volume homeostasis may underlie some of the functional disturbances still observed in a significant proportion of liver transplantation's.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are greatly indebted to Jean-Luc Déry for the development of the imaging software and to Michel Brunette for his continued technical support. We thank Drs. A. Berteloot, P.M. Huet and G. Roy of the Université de Montréal for critical reading of the manuscript.

REFERENCE LIST

1. STRASBERG, S.M., HOWARD, T.K., MOLMENTI, E.P. and HERTL, M. *"Selecting the donor liver: Risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation."* Hepatology. 1994 ; 20 : 829-838.
2. KAHN, D., ESQUIVEL, C.O., MAKOWKA, L., et al. *"Causes of death after liver transplantation in children treated with cyclosporine and steroids."* Clin. Transplantation. 1989 ; 3 : 150-155.
3. ZWEIER, J.L., KUPPUSAMY, P. and LUTTY, G. *"Measurement of endothelial cell free radical generation: Evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues."* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988 ; 85 : 4046-4050.
4. DE GROOT, H. and BRECHT, M. *"Reoxygenation injury in rat hepatocytes: Mediation by O₂-/H₂O₂ liberated by sources other than xanthine oxidase."* Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1991 ; 372 : 35-41.
5. UMESHITA, K., MONDEN, M., FUJIMORI, T., et al. *"Extracellular calcium protects cultured rat hepatocytes from injury caused by hypothermic preservation."* Cryobiology. 1988 ; 25 : 102-109.
6. FOX, L.E., MARSH, D.C., SOUTHARD, J.H. and BELZER, F.O. *"The effect of pH on the viability of hypothermically stored rat hepatocytes."* Cryobiology. 1989 ; 26 : 186-190.
7. FULLER, B.J., BUSZA, A.L., PROCTOR, E., MYLES, M., GADIAN, D.G. and HOBBS, K.E.F. *"Control of pH hypothermic liver storage: The role of storage solution."* Transplantation. 1988 ; 45(1) : 239-241.

8. MARSH, D.C., LINDELL, S.L., FOX, L.E., BELZER, F.O. and SOUTHARD, J.H. *"Hypothermic preservation of hepatocytes. I. Role of cell swelling."* Cryobiology. 1989 ; 26 : 524-534.
9. VAN ROSSUM, G.D.V. and RUSSO, M.A. *"Requirement of Cl⁻ and for the Ouabain-resistant control of cell volume in slices of rat liver."* J. Membr. Biol. 1984 ; 77 : 63-76.
10. CARLES, J., FAWAZ, R., NEAUD, V., et al. *"Ultrastructure of human liver grafts preserved with U.W. solution. Comparison between patients with low and high postoperative transaminases levels."* J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 1994 ; 26 : 67-73.
11. SOUTHARD, J.H. and BELZER, F.O. *"Organ preservation."* Annu. Rev. Med. 1995 ; 46 : 235-247.
12. CALWELL-KENKEL, J.C., CURRIN, R.T., TANAKA, Y., THURMAN, R.G. and LEMASTERS, J.J. *"Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers : Effects of reperfusion."* Hepatology. 1991 ; 13 : 83-95.
13. VREUGDENHIL, P.K., MARSH, D.C., BELZER, F.O. and SOUTHARD, J.H. *"Urea and protein synthesis in cold-preserved isolated rat hepatocytes."* Hepatology. 1992 ; 16 : 241-246.
14. HAEUSSINGER, D. and LANG, F. *"Cell volume in the regulation of hepatic function : a mechanism for metabolic control."* Biochim. Biophys. Acta. 1991 ; 1071 : 331-350.
15. GRAF, J., HADDAD, P., HAEUSSINGER, D. and LANG, F. *"Cell volume regulation in liver."* Renal Physiol Biochem. 1988 ; 3-5 : 202-220.

16. HADDAD, P. and GRAF, J. "*Volume-regulatory K⁺ fluxes in the isolated perfused rat liver : characterisation by ion transport inhibitors.*" Am. J. Physiol. 1989 ; 257 : G357-G363.
17. CORASANTI, J.G., GLEESON, D. and BOYER, J.L. "*Effects of osmotic stresses on isolated rat hepatocytes I. Ionic mechanisms of cell volume regulation.*" Am. J. Physiol. 1990 ; 258 : G290-G298.
18. HADDAD, P., BECK, J.S., BOYER, J.L. and GRAF, J. "*Role of chloride ions in liver cell volume regulation.*" Am. J. Physiol. 1991 ; 261 : G340-G348.
19. GLEESON, D., CORASANTI, J.G. and BOYER, J.L. "*Effects of osmotic stresses on isolated rat hepatocytes II. Modulation of intracellular pH.*" Am. J. Physiol. 1990 ; 258 : G299-G307.
20. GRINSTEIN, S., ROTHSTEIN, A., SARKADI, B. and GELFAND, E.W. "*Responses of lymphocytochromes to anisotonic media : volume-regulating behaviour.*" Am. J. Physiol. 1984 ; 246 : C204-C215.
21. HOFFMANN, E.K., LAMBERT, L.H. and SIMONSEN, L.O. "*Mechanisms in volume regulation in Ehrlich ascites tumour cells.*" Renal Physiol Biochem 1988 ; 3-5 : 221-247.
22. HAEUSSINGER, D., STEHLE, T. and LANG, F. "*Volume regulation in liver : Further characterisation by inhibitors and ionic substitutions.*" Hepatology. 1990 ; 11 : 243-254.
23. HADDAD, P., THALHAMMER, T. and GRAF, J. "*Effect of hypertonic stress on liver cell volume, bile flow, and volume-regulatory K⁺ fluxes.*" Am. J. Physiol. 1989 ; 256 : G563-G569.

24. CHWALBINSKA-MONETA, J. "*Role of hepatic portal osmoreception in the control of ADH release.*" Am. J. Physiol. 1979 ; 236 : E603-E609.
25. KRISTENSEN, L.O. "*Associations between transports of alanine and cations across cell membrane in rat hepatocytes.*" Am. J. Physiol. 1986 ; 251 : G575-G584.
26. BAKKER-GRUNWALD, T. "*Potassium permeability and volume control in isolated rat hepatocytes.*" Biochim. Biophys. Acta. 1983 ; 731 : 239-242.
27. KRISTENSEN, L.O. and FOLKE, M. "*Volume-regulatory K⁺ efflux during uptake of alanine in isolated rat hepatocytes.*" Biochem. J. 1984 ; 221 : 265-268.
28. WETTSTEIN, M., VON DAHL, S., LANG, F., GEROK, W. and HAEUSSINGER, D. "*Cell volume regulatory responses of isolated perfused rat liver : The effect of amino acids.*" Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1990 ; 371 : 493-501.
29. MOSELEY, R.H. "*Hepatic uptake of amino acids.*" In : *Hepatic Transport and Bile Secretion : Physiology and Pathophysiology*, edited by TAVOLONI, N. and BERK, P.D. New York : Raven Press, 1993, p. 337-349.
30. HAIMOVICI, J., BECK, J.S., VALLERAND, D., MOLLA-HOSSEINI, C. and Haddad, P. "*Different modulation of hepatocellular Na⁺/H⁺ exchange activity by insulin and EGF.*" Am. J. Physiol. 1994 ; 267 : G364-G370.
31. BISSELL, D.M., ARENSON, D.M., MAHER, J.J. and ROLL, F.J. "*Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver.*" J. Clin. Invest. 1987 ; 79 : 801-812.
32. CHRISTENSEN, H.N. "*Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism.*" Physiol. Rev. 1990 ; 70 : 43-77.

33. SUMIMOTO, R., DOHI, K., URUSHIHARA, T., et al. *"An examination of the effects of solutions containing histidine and lactobionate for heart, pancreas, and liver preservation in the rat."* Transplantation. 1992 ; 53 : 1206-1210.
34. SANDKER, G.W., SLOOFF, M.J.H. and GROOTHUIS, G.M.M. *"Drug transport, viability and morphology of isolated rat hepatocytes preserved for 24 hours in University of Wisconsin solution."* Biochem. Pharmacol. 1992 ; 43 : 1479-1485.
35. MARSH, D.C., HJELMHAUG, J.A., VREUGDENHIL, P.K., and al. *"Hypothermic preservation of hepatocytes. III. Effects of resuspension media on viability after up to 7 days of storage."* Hepatology. 1991 ; 13 : 500-508.
36. MARSH, D.C., BELZER, F.O. and SOUTHARD, J.H. *"Hypothermic preservation of hepatocytes. II. Importance of Ca²⁺ and amino acids."* Cryobiology. 1990 ; 27 : 1-8.
37. BAQUET, A., HUE, L., MEIJER, A.J., VAN WOERKOM, G.M. and PLOMP, P.J.A.M. *"Swelling of rat hepatocytes stimulates glycogen synthesis."* J. Biol. Chem. 1990 ; 265 : 955-959.
38. MEIJER, A.J., BAQUET, A., GUSTAFSON, L., VAN WOERKOM, G.M. and HUE, L. *"Mechanism of activation of liver glycogen synthase by swelling."* J. Biol. Chem. 1992 ; 267 : 5823-5828.
39. EDMONDSON, J.W. and LUMENG, L. *"Biphasic stimulation of amino acid uptake by glucagon in hepatocytes."* Biochem. Biophys. Res. Comm. 1980 ; 96 : 61-68.

40. KILBERG, M.S., CHRISTENSEN, H.N. and HANDLOGTEN, M.E. "*Cysteine as a system-specific substrate for transport system ASC in rat hepatocytes.*" Biochem. Biophys. Res. Comm. 1979 ; 88 : 744-751.
41. KILBERG, M.S., HANDLOGTEN, M.E. and CHRISTENSEN, H.N. "*Characteristics of amino acid transport system in rat liver for glutamine, asparagine, histidine, and closely related analogs.*" J. Biol. Chem. 1980 ; 255 : 4011-4019.
42. TAMARAPPO, B.K., HANDLOGTEN, M.E., LAINE, R.O., SERRANO, M.A., DUGAN, J. and KILBERG, M.S. "*Identification of protein responsible for hepatic system N amino acid transport activity.*" J. Biol. Chem. 1992 ; 267 : 2370-2374.
43. FORESTAL, D.A., HAIMOVICI, J. and HADDAD, P. "*Cold preservation and rewarming differentially affects Na^+/H^+ , $Na^+(HCO_3^-)_n$ and Cl^-/HCO_3^- transport activity in isolated rat hepatocytes.*" Am. J. Physiol. 1997 ; 272 : G638-G64.

Table VII

Effect of cold preservation and rewarming on cell viability and morphological integrity

Time in U.W. solution (hour)	Cell viability (% Trypan Blue exclusion) After cold storage	N	Cell viability (% Trypan Blue exclusion) After rewarming	N	Morphological integrity of cells submitted to hypotonic stress
0	91.1 ± 1.8	(23)	76.1 ± 2.6†	(5)	81/126 (64.3%)
24	84.9 ± 2.3*	(23)	67.8 ± 3.1*†	(5)	65/108 (60.2%)*
48	81.6 ± 2.6*	(22)	63.1 ± 3.3*†	(5)	59/110 (53.6%)*
72	75.8 ± 2.8*	(21)	47.4 ± 3.2*†	(5)	38/85 (44.7%)*

Hepatocytes were purified by centrifugation on a Percoll gradient and suspended in U.W. solution at 4°C for up to 72 hours. At 24 hour intervals preserved cells were resuspended in cold Williams E medium and cell viability tested by exclusion of Trypan Blue ("After cold storage"). In a subset of experiments, after cold storage, cells were suspended in warm Williams E medium and incubated at 37°C for 1-2 hours. Cell viability was then evaluated by exclusion of Trypan Blue ("After rewarming"). Morphological integrity represents the number of cells which resisted hypotonic stress (uninterrupted cell borders and no blebs) in relation to the total number of cells which were observed in the microscopic field. Statistical significance between group means was evaluated by analysis of variance (ANOVA). Pairwise comparisons were then evaluated by Bonferroni's test.

†:Significantly different from viability before rewarming ($p < 0.05$). Values are representative of the number of cell preparations indicated in parentheses and are presented as means ±SEM. *:Significantly different from control - 0 hr ($p < 0.05$).

Table VIII.

Effect of cold preservation and rewarming on regulatory volume decrease

Time in U.W. solution (hour)	Initial volume (pL)	Maximum volume (% init. vol.)	RVD (pL.min ⁻¹)	N
0	8.1 ± 0.5	119.3 ± 1.8	0.135 ± 0.018	(18)
24	8.3 ± 0.7	120.1 ± 1.6	0.105 ± 0.012*	(18)
48	7.3 ± 0.9	118.2 ± 2.4	0.095 ± 0.010*	(17)
72	7.4 ± 1.2	118.4 ± 1.9	0.080 ± 0.007*	(16)
ANOVA	p = 0.318	P = 0.567	p = 0.021	

Hypotonic stress was induced for a period of 10 min by the removal of 40 mM NaCl from control KHB. RVD is calculated as the slope of the first 5 minutes after maximum volume induced by hypotonic stress, as illustrated in Fig 1 and 2A. Statistical significance between group means was evaluated by analysis of variance (ANOVA). Pairwise comparisons were then evaluated by Bonferroni's test.

* : Significantly different from control ($p < 0.05$). Values are representative of the number of cell preparations indicated in parentheses and are presented as means \pm SEM.

Table IX.

Effect of cold preservation and rewarming on regulatory volume increase

Time in U.W. solution (hr)	Minimum volume (pL)	Minimum volume (% init. vol.)	RVI (pL.min ⁻¹)	N
0	7.4 ± 0.5	89.7 ± 0.9	0.058 ± 0.009	(18)
24	7.6 ± 1.3	91.1 ± 1.4	0.057 ± 0.008	(18)
48	6.4 ± 1.1	89.3 ± 1.2	0.031 ± 0.004*	(17)
72	6.6 ± 1.7	90.8 ± 1.9	0.047 ± 0.006*	(16)
ANOVA	p = 0.179	p = 0.187	P = 0.043	

After hypotonic stress during 10 minutes (Table VIII), isotonicity was restored by returning to control KHB. RVI is calculated as the slope of the first 5 minutes after minimum volume induced by isotonic return, as illustrated in Fig 1 and 2B. Statistical significance between group means was evaluated by analysis of variance (ANOVA). Pairwise comparisons were then evaluated by Bonferroni's test.

* : Significantly different from control ($p < 0.05$). Values are representative of the number of cell preparations indicated in parentheses and are presented as means ±SEM.

Table X

Effect of cold preservation and rewarming on Na⁺ dependent amino acid- induced cell swelling

Time in U.W. solution (hour)	Proline (pL.min ⁻¹)	N	Glutamine (pL.min ⁻¹)	N	α AIB (pL.min ⁻¹)	N
0	0.160 \pm 0.044	(14)	0.140 \pm 0.032	(14)	0.072 \pm 0.032	(14)
24	0.080 \pm 0.014*	(13)	0.137 \pm 0.031	(14)	0.036 \pm 0.029	(13)
48	0.060 \pm 0.012*	(12)	0.164 \pm 0.024	(13)	0.060 \pm 0.050	(13)
72	0.040 \pm 0.027*	(11)	0.093 \pm 0.008	(12)	N.D.	(9)
ANOVA	p = 0.03		p = 0.48		p = 0.32	

Concentrative amino acid uptake was evaluated as the initial slope (first minute) of the rapid increase in cell volume observed upon administration of each amino acid as illustrated in Figure 3, page 73. The Na⁺-dependent component was obtained by subtracting the average initial slope observed in several cells in choline media (not significantly different from 0) from the individual initial slopes obtained for each cell in Na⁺-containing buffer. Only system ASC (proline) is affected. N.D. - not detectable (see materials and methods). Statistical significance between group means was evaluated by analysis of variance (ANOVA). Pairwise comparisons were then evaluated by Bonferroni's test. * :Significantly different from control (p < 0.05). Values are representative of the number of cell preparations indicated in parentheses and are presented as means \pm SEM.

Table XI

Effect of cold preservation and rewarming on morphological integrity of hepatocytes after concentrative amino acid uptake

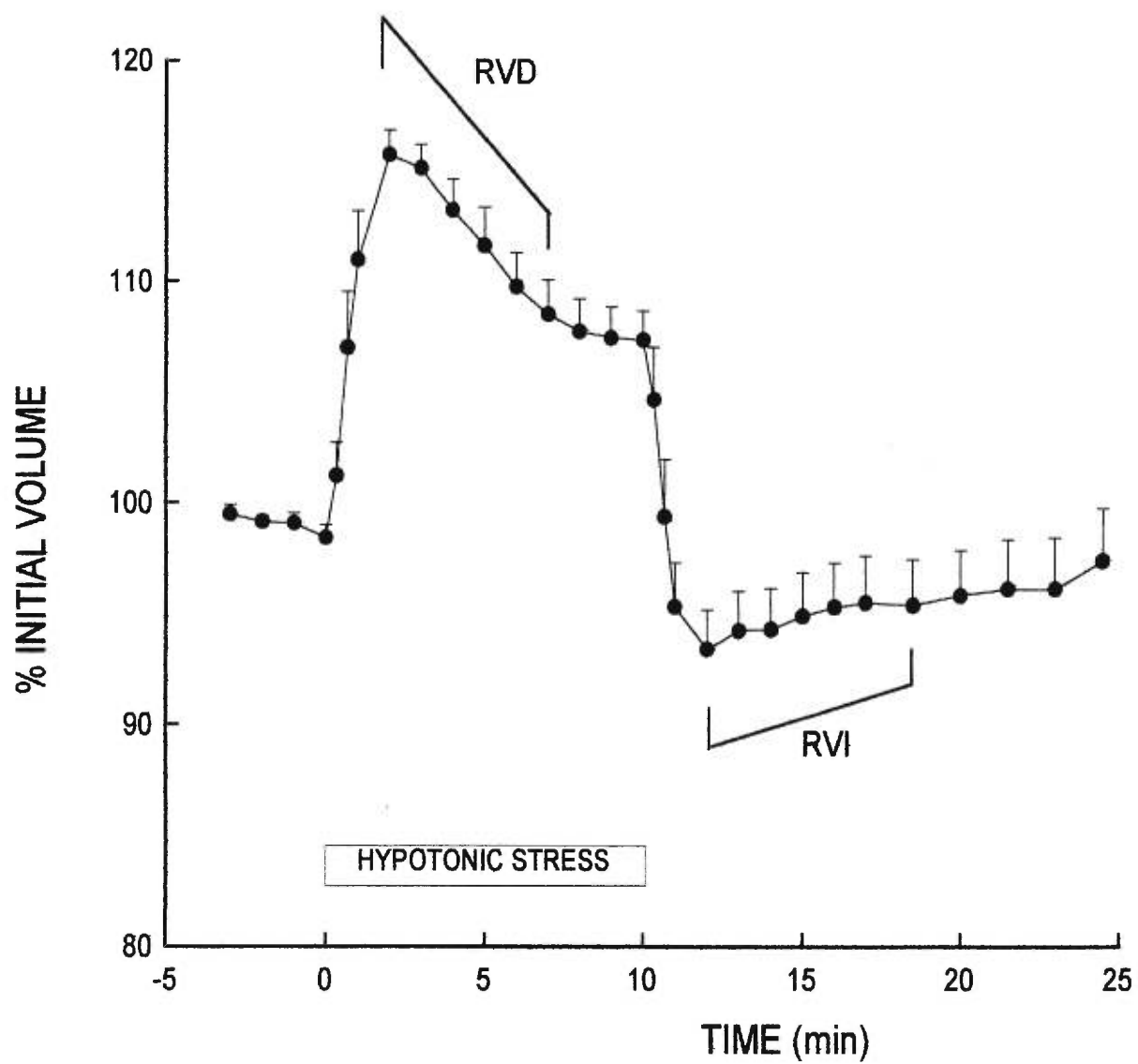
Time in U.W. solution (hours)	α -AIB	Proline	Glutamine
0	68/89 (80.0%)	70/89 (71.4%)	68/98 (69.4%)
24	60/79 (79.9%)	62/90 (68.9%)	58/89 (65.2%)
48	39/70 (55.7%)*	50/78 (64.1%)	46/76 (60.5%)
72	13/45 (28.9%)*	38/72 (52.8%)*	35/68 (51.5%)*

Morphological integrity represents the number of cells which remained intact (uninterrupted cell borders and no blebs) in relation to the total number of cells which were observed in the microscopic field. Corresponding percentages are indicated in parentheses. Differences between preservation times were evaluated by Chi-square analysis of contingency tables for each amino acid.

* : Significantly different from expected counts ($p < 0.05$)

Legende to Figure 2.1

Hypotonic stress was induced at time 0 by administration of KHB solution where 40 mM NaCl was removed for 10 min. RVD is calculated as the slope of the first 5 minutes after maximum volume induced by hypotonic stress. RVI is calculated on the slope of the first 5 minutes after minimum volume induced by isotonic return. Each point represents the mean \pm SE of 13 independent experiments.

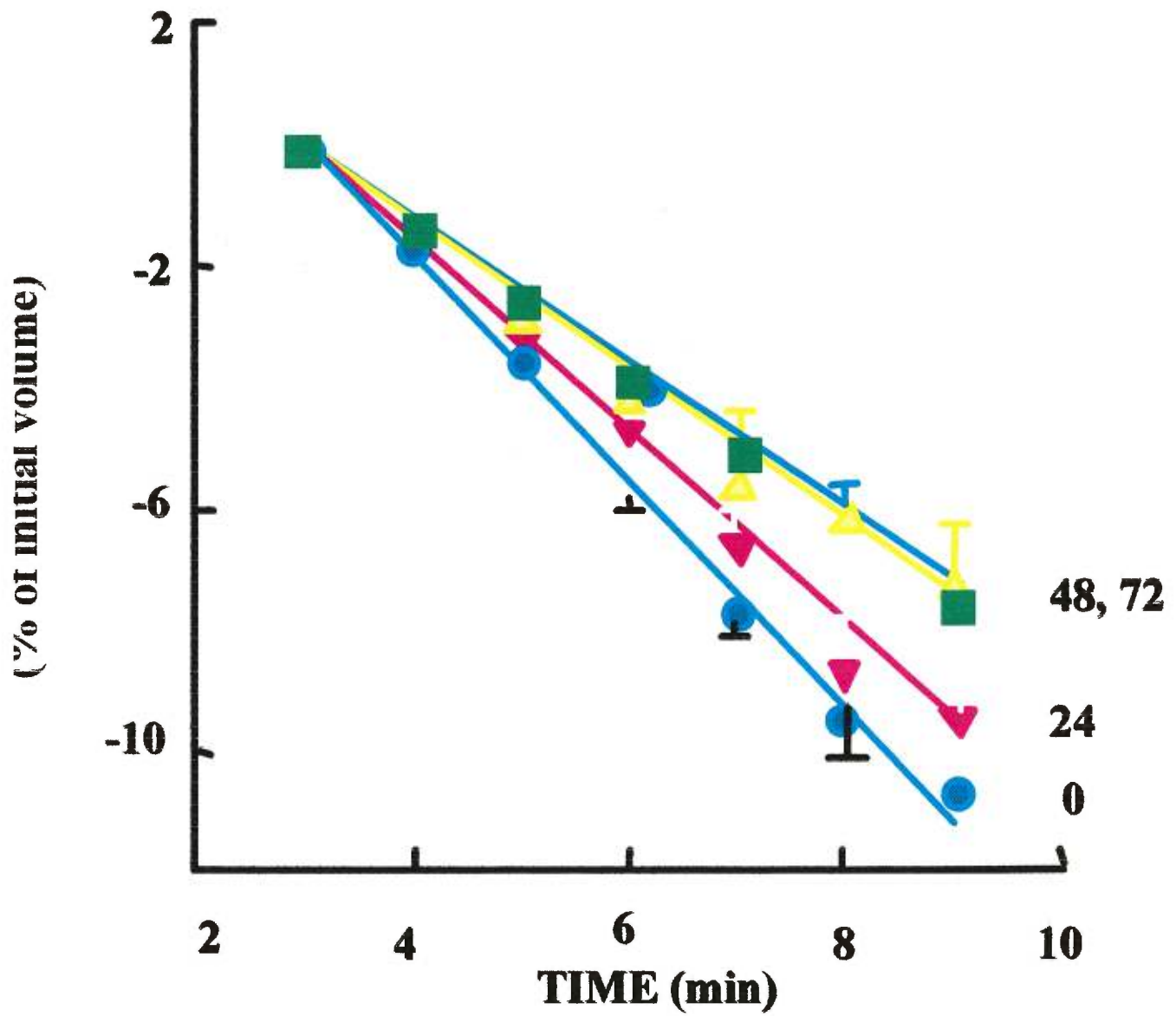
Effect of hypotonic stress on liver cell volume

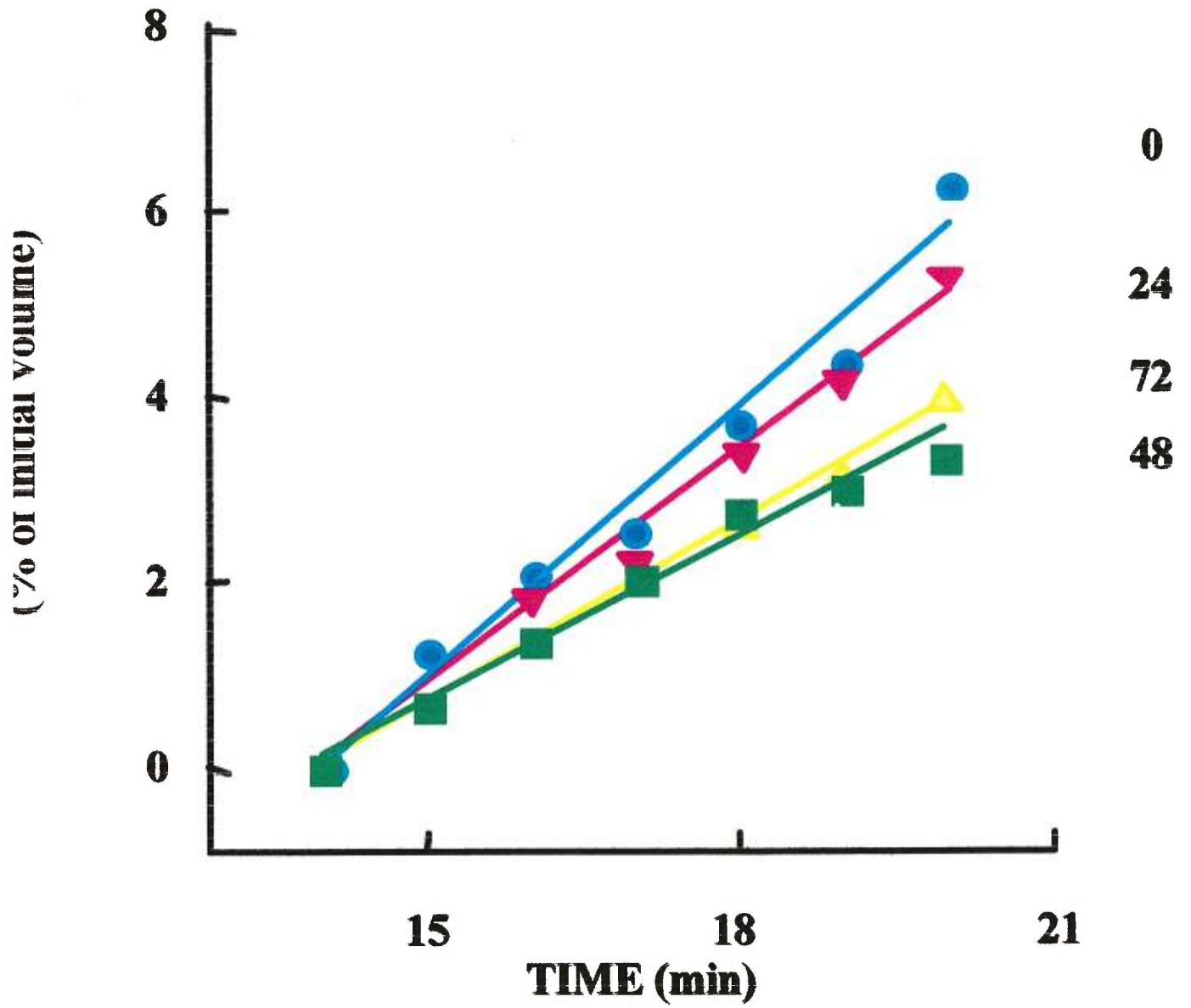
Legende to Figure 2.2

Initial volume changes from maximal swollen volume upon induction of hypotonic stress (A) and from minimal shrunken (B) volume upon return to isotonic KHB buffer were measured after the following cold storage times in U.W. solution: 0 (○), 24 (▽), 48 (■) and 72 (△) hours. Note the gradual decrease in the initial rates of RVD and RVI as preservation time increases.

Effect of cold preservation and rewarming on RVD (A)

after hypotonic stress and return to isotonicity.



Effect of cold preservation and rewarming on RVI (B)after hypotonic stress and return to isotonicity.

Legende to Figure 2.3

α -AIB (A), proline (B) and glutamine (C) were administered individually at a concentration of 10 mM each at time 0, in the presence (+Na⁺) or absence (-Na⁺) of external sodium ions. Values represent the % change above initial cell volume which was 7.5 ± 0.6 , 8.3 ± 0.4 and 7.2 ± 0.5 pL for α -AIB, proline and glutamine experiments respectively. Each point represents the mean \pm SE of 21 cell preparations (3 to 8 cells in each).

Figure 2.3.A

Effect of amino isobutyric acid uptake on cell volume of isolated hepatocytes

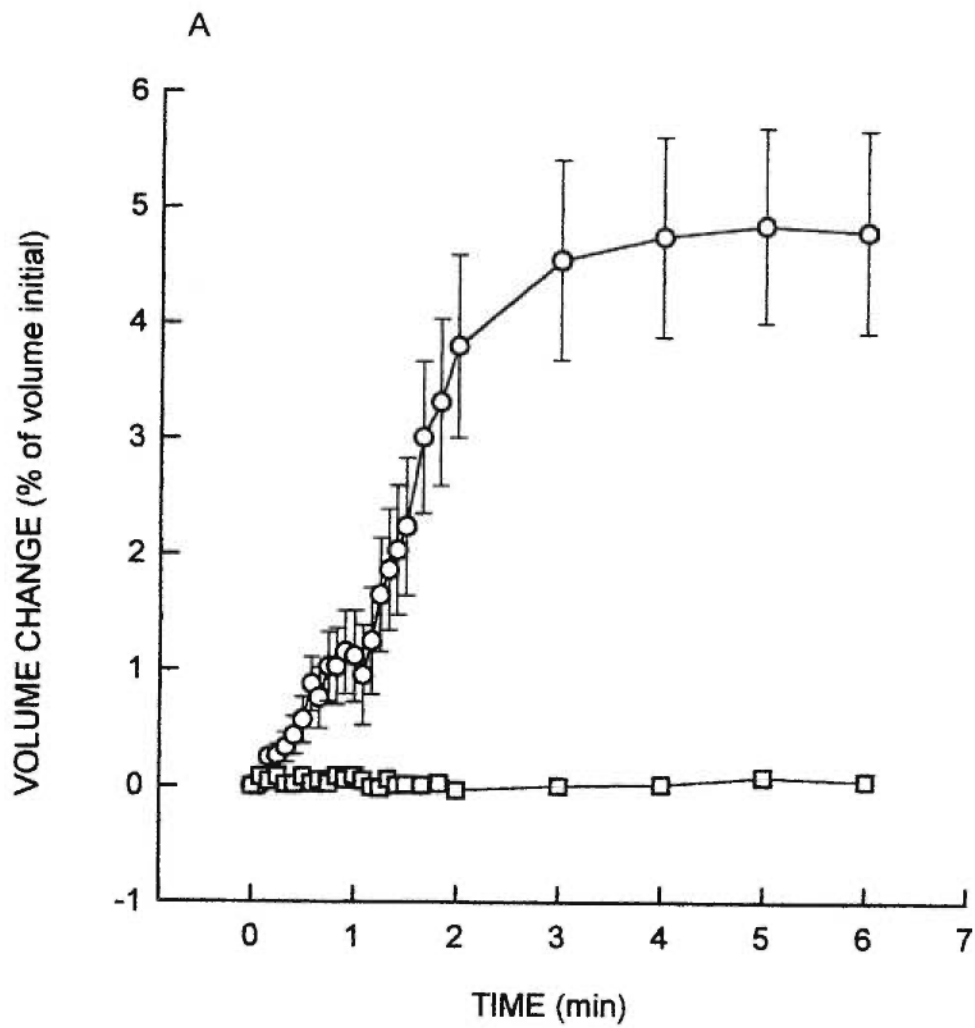


Figure 2.3.B

Effect of Proline uptake on cell volume of isolated hepatocytes

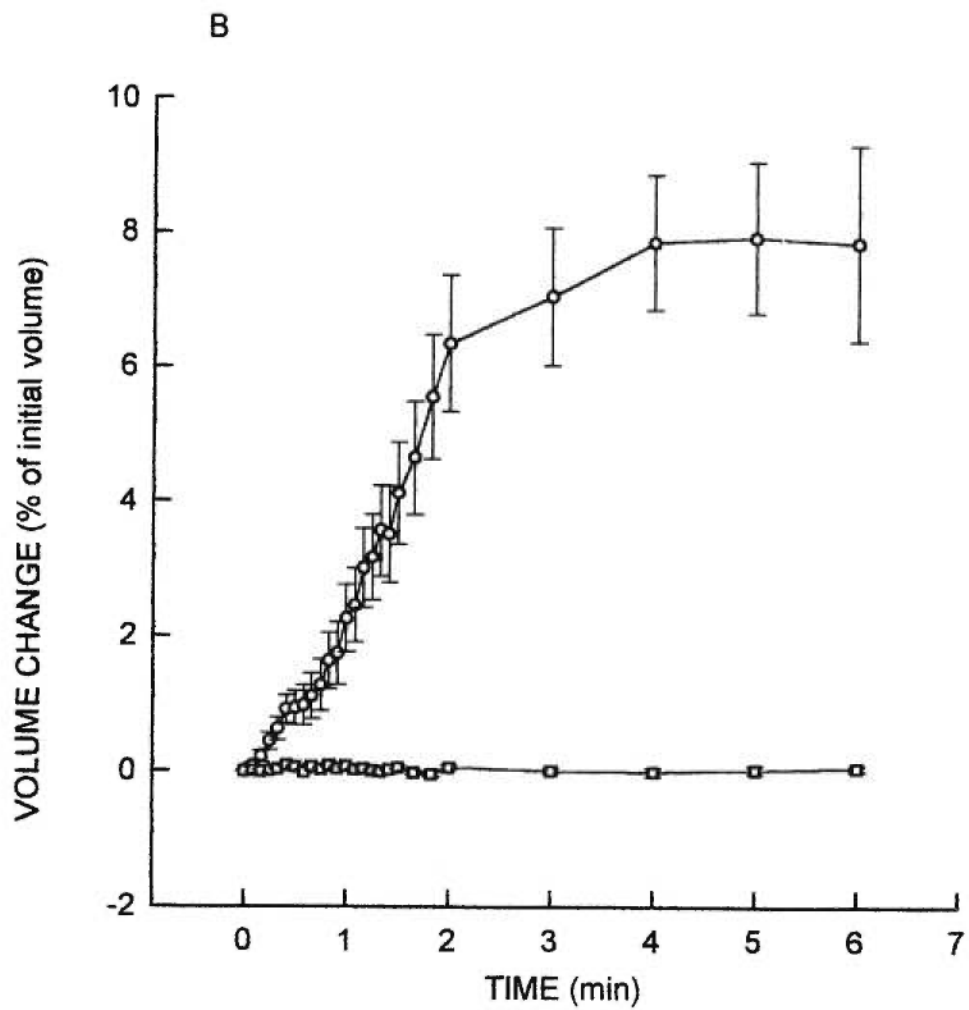
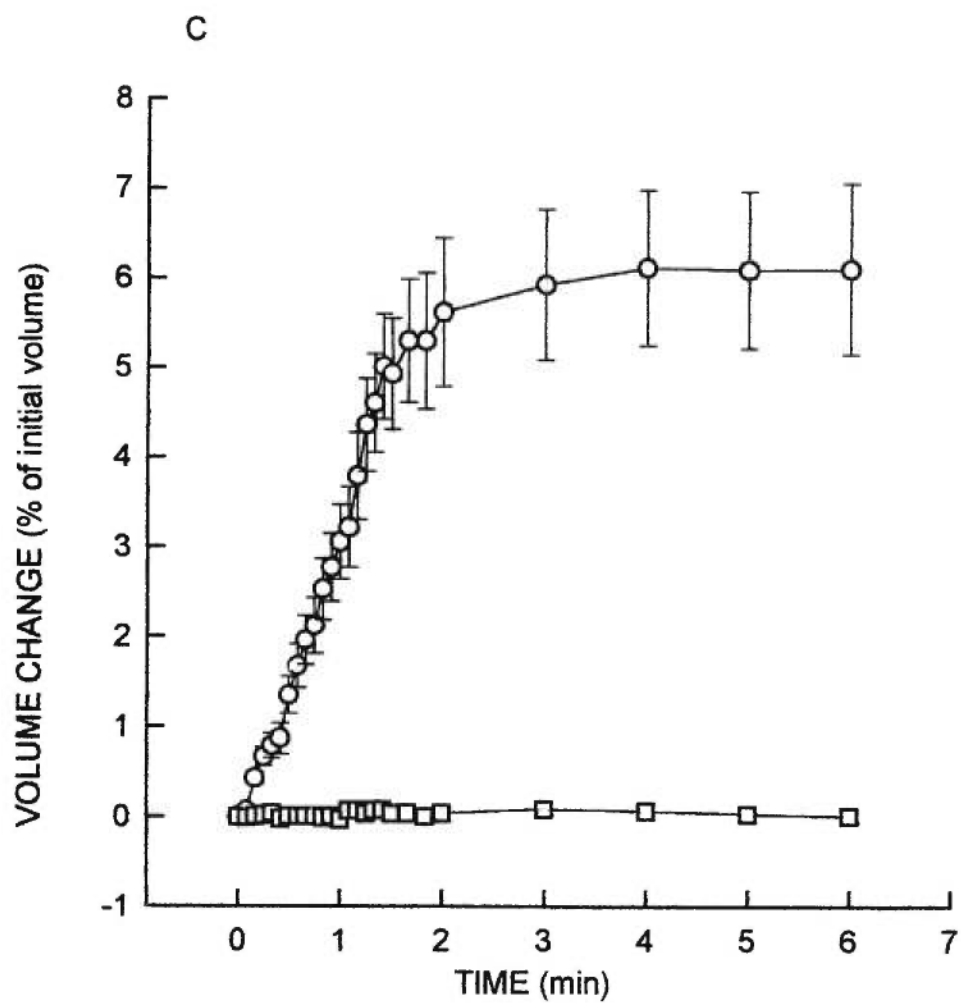


Figure 2.3.C

Effect of Glutamine uptake on cell volume of isolated hepatocytes



CHAPITRE 3

**COMPARATIVE EFFECTS OF UW AND SLS SOLUTIONS
ON CONCENTRATIVE PROLINE UPTAKE IN COLD
*PRESERVED RAT HEPATOCYTES***

Par

Halima SERRAR, Lina MUSALLAM et Pierre HADDAD

Sous presse dans

Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.

**COMPARATIVE EFFECTS OF UW AND SLS SOLUTIONS
ON CONCENTRATIVE PROLINE UPTAKE IN COLD
PRESERVED RAT HEPATOCYTES**

Halima SERRAR^{1,2}, Lina MUSALLAM^{1,2} and Pierre HADDAD^{1,2}

Accepted for publication in Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.

Grant Support

These studies were supported by a grant from the Medical Research Council of Canada (PG-11118 to P.H.). H.S. received a graduate studentship from the Groupe de recherche en transport membranaire made possible by an infrastructure grant from the Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec. P.H. is a Senior Research Scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

ABBREVIATIONS

- EC = Euro-Collins ; — SLS = Sodium-lactobionate-sucrose ;
— UW = University of Wisconsin.

¹ Groupe de recherche en transport membranaire

² Département de pharmacologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, CANADA, H3C 3J7.

ABSTRACT

Background

In previous studies, we have shown that the rate of cell swelling induced by concentrative proline uptake in isolated rat hepatocytes decreased by 50% after only 24 hours of cold storage in University of Wisconsin (U.W.) solution, thereby representing a sensitive marker of alterations in hepatocytes functions after cold preservation and rewarming. We have thus used concentrative proline uptake to compare the capacity of U.W. and sodium-lactobionate-sucrose (SLS) solutions to maintain such differentiated hepatocyte functions.

Methods

Isolated rat hepatocytes were kept at 4°C for 4, 10, 24 and 48 hours in U.W. or SLS solutions, and subsequently cultured at 37°C for 1-2 hours. Viability was measured by Trypan blue exclusion. After rewarming, cells were subjected to a 10 minutes administration of 10 mM proline and accumulation of the amino acid was assessed by changes in cell volume as measured by digital analysis of single cell images obtained under bright-field illumination.

Results

Cell viability was reduced gradually and significantly after 0 to 48 hours of preservation, and rewarming amplified this effect. However, loss of viability was similar in U.W.- and SLS-stored cells, as were initial steady-state cell volumes. Proline-induced swelling rate was reduced significantly by 13, 46 and by 57% after 10, 24 and 48 hours of

preservation in U.W. solution, respectively. There is no significant difference between SLS- and U.W. preserved hepatocytes swelling rates after 10 hours and 48 hours of cold preservation. However the decline in the swelling rate of SLS-preserved hepatocytes incubated for 24 hours is significantly lower than that of their U.W. preserved counterparts. 24 hours.

Conclusions

These results show that the SLS solution can preserve differentiated hepatic functions as well as the U.W. solution does.

INTRODUCTION

Liver transplantation is an effective therapy for end stage liver disease. However, several problems remain to be resolved. In particular, ischemia/reperfusion injury which plays an important determining factor in poor transplantation prognosis. Indeed, it's one of the most important causes of primary dysfunction (PDF) as well as non-function (PNF) of liver grafts (1;2). Eventhough, developments in preservation conditions in the past decade have greatly improved the success rate of liver transplantation, however, PDF and PNF continue to present substantial problems which contribute to mortality rates of 15-25% within the first year after surgery (2). Initially, the Euro-Collins (EC) solution was used for liver preservation in many transplant centers but with limited hypothermic storage time: 6 to 10 hours (3). In 1987, Belzer and Southard developed a storage solution at the University of Wisconsin (the U.W. solution) which gradually replaced EC solution, and increased the preservation time to 12-24 hours.(4). Despite this improvement, an unacceptable proportion of liver grafts still show PDF or PNF. Therefore, it remains important to develop better preservation conditions.

Several studies have been conducted to test the importance of the various components of the U.W. solution, and lactobionate was found to be the key element in improving liver preservation in particular, in contrast to other organs such as heart, kidney and lung (4). Consequently, a much simpler variant called sodium-lactobionate-sucrose solution (SLS solution) was produced and it yielded promising results in the rat orthotopic liver transplantation (OLT) model (3). Although, tests of potentially beneficial changes to storage solution on animal models is inevitable, it is also important to develop

simple, rapid, cost-effective and reliable models to screen such changes. In this context, isolated liver cells represent an interesting avenue. However, several studies to this date have focused on gross indices of liver cell integrity such as loss of cytosolic enzymes or exclusion of vital dyes. We have recently used a simple *in vitro* model, based on isolated rat hepatocytes, to study the impact of cold preservation and rewarming on membrane transport function (5;6). Such studies have shown that the capacity of isolated hepatocytes to counter cell volume (6) or pH (5) changes was significantly attenuated as a function of the period of cold storage in U.W. solution. We also studied the rate of cell swelling induced by concentrative amino acid uptake (7), a more physiological test of hepatocyte function than osmotically-induced cell volume changes (8). We found that the rate of cell swelling induced by proline was very sensitive to cold storage in U.W. solution (50% decrease after only 24 hours of preservation) as opposed to glutamine or to an alanine analogue (6). This has led us to propose that proline-induced cell swelling represents a sensitive functional index of liver cell integrity. Therefore, the purpose of the present study was to compare the efficacy of the U.W. and SLS solutions to maintain concentrative proline transport function by assessing the volume changes induced by this amino acid's uptake.

MATERIALS AND METHODS:

Cell isolation, preservation and short-term culture.

Hepatocytes were isolated from the livers of fed male Sprague-Dawley rats weighting 150-200 g (Charles River, St-Constant, Québec) by a variation of the classical collagenase perfusion as described previously (9). Hepatocytes were

purified by centrifugation on a Percoll gradient and viability was assessed by exclusion of Trypan Blue. The cells were then suspended in U.W. or SLS solution (Table XII) and kept at 4°C for 4, 10, 24 and 48 hours. Thereafter, U.W. or SLS was aspirated and the preserved cells suspended in cold Williams' E medium to assess cell viability by the Trypan Blue exclusion test. In parallel studies, a portion of cells were suspended in warm bicarbonate-buffered Williams' E medium for 1-2 hours and cell viability measured again using Trypan Blue exclusion to examine the effect of rewarming (4).

After the designated cold storage times, the cells were cultured in warm bicarbonate-buffered Williams' E medium after being seeded ($7.5-8.5 \times 10^5$ cells/ml) onto round glass coverslips coated with Matrigel (Collaborative Research,). Cells were incubated for 1-2 hours at 37°C in a humidified atmosphere of 95% O₂/ 5% CO₂ before the onset of volume experiments. Our previous studies (6) have confirmed that Matrigel is capable of preserving the spherical shape as well as better adherence of hepatocytes which was reported by others (10) which is more advantageous to the fragile adherence to glass alone used in earlier studies (11).

Table XII.

Composition of Liver Preservation Solutions

<i>COMPONENT</i>	<i>U.W.</i>	<i>SLS</i>
Na	25	155
K	125	5
Mg	5	5
PO ₄	25	25
SO ₄	5	5
Sucrose	---	75
Raffinose	30	---
Lactobionate	100	100
GSH	3	3
Adenosine	3	---
Allopurinol	1	---
Pentafraction (HES)	50g/L	---
Penicillin	200,000u/L	---
Insulin	40u/L	---
Dexamethasone	16mg/L	---

Adapted from Southard and Belzer (4).

All values are in mmols/L unless otherwise indicated.

Experimental solutions and protocols

At the end of the warm culture period, coverslips with adhering cells were placed on the stage of an inverted microscope (Olympus IM-T2, Carsen Medical Systems, ON) in a specially-designed perfusion bath. Cells were perfused with HEPES-buffered solution containing (in mM): 138 NaCl, 10 HEPES, 10 sucrose, 5.5 D-glucose, 3.8 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄ and 1 Na-pyruvate (pH 7.4 at 37°C with NaOH). Proline was administered to the cultured hepatocytes at final concentrations ranging from 0.1 to 10 mM by iso-osmotic replacement of sucrose which is present in the control buffer. In order to establish the Na⁺-dependence of amino acid transport, identical parallel experiments were conducted using solutions where Na⁺ was iso-osmotically replaced by choline⁺. In all experiments, solutions were equilibrated with 100% O₂ and maintained at 37 ± 1°C using a fabricated heating tube which kept bath temperature constant.

Measurement of cell volume

Bright field images of several single hepatocytes were adjusted for high contrast and sequentially captured by a DAGE CCD-72 camera. The digitized images were stored on computer and later transferred onto magnetic tape with a Tape Back-up system. The analysis consisted in the calculation of the number of pixels in the surface area after cellular contours were detected by a special algorithm with a costem-made software program (Groupe de recherche en transport membranaire). Cell volumes were geometrically derived from these circular surface areas based on the assumption that hepatocytes are maintained in spherical shape by Matrigel as previously ascertained (11). The system was calibrated with a standard micrometer. Concentrative proline uptake was evaluated as the

initial slope (first minute) of the increase in cell volume observed after administration of proline. The Na^+ -dependent component was obtained by subtracting the average initial slope observed in several cells in choline⁺ media from the individual initial slopes obtained for each cell in Na^+ -containing buffer.

Data analysis and statistics.

Cell volume measurements were made in 5 to 12 cells at each time point for each hepatocyte preparation. The relationship between proline concentration and initial swelling rate was analyzed by the Allfit program. For the effect of preservation solutions, results were analyzed by one-way or two-way ANOVA for repeated measures (using SigmaStat from Jandel Scientific, ...CA) by comparing the average values of all determinations obtained at each time point for a given preparation. Results are presented as the mean \pm SEM and N thus represents the number of cell preparations (animals) rather than the number of cells studied.

RESULTS

Dose-response relationship of proline-induced cell swelling

In previous studies, we have confirmed that amino acid-induced cell swelling reflected concentrative amino acid uptake as demonstrated by Na^+ -dependence and by the responsiveness of alanine-induced swelling rate to hormonal stimulation with glucagon (6). In the present study, we have carried out a dose-response curve for Na^+ -dependent proline-induced cell swelling. As illustrated in Figure 3.1, initial swelling rate exhibited a typical saturable dose-response relationship with proline concentration. Analysis of the

dose-response curve yielded an EC50 value of 0.11 mM, confirming the sensitivity of this approach and its usefulness for functional studies of concentrative amino acid uptake.

Effect of cold preservation and of rewarming on cell viability and steady-state cell volume :

As we observed previously with U.W.-stored hepatocytes (6), cell viability gradually diminished as a function of cold storage time (Figure 3.2). Indeed, viability is reduced slightly but significantly after as little as 10 hr of preservation in cold U.W. solution as compared to unstored controls (Figure 3.2.A). As also reported previously (6), short-term rewarming greatly accentuates the proportion of non-viable cells, but the time-dependence of the viability loss remains similar (Figure 3.2.A). In the present study, we have observed that identical cell viability results are obtained when SLS solution is used for cold storage as compared to U.W. solution (Figure 3.2.B).

Table XIII presents the hepatocyte steady-state volume measured before addition of proline in Na⁺-containing buffer for cells stored in cold U.W. or SLS solution for variable time periods followed by short-term warm culture. Cell volume was not significantly affected by preservation time or by the preservation solution used to store the cells at 4°C.

Table XIII

Effects of cold preservation time and solution on steady-state volume and on maximal volume in isolated rat hepatocytes treated with 10 mM Proline

Time		solution U.W.		solution SLS	
Hours	Initial volume (pL)	Maximum volume (pL)	Initial volume (pL)	Maximum volume (pL)	N
0	6.1 ± 0.3	8.8 ± 0.5	6.1 ± 0.3	8.8 ± 0.5	8
4	5.4 ± 0.4	9.1 ± 0.9	6.4 ± 0.6	9.4 ± 0.9	8
10	5.3 ± 0.4	8.4 ± 0.6	6.4 ± 0.4	8.4 ± 1.0	8
24	6.3 ± 0.3	7.1 ± 0.8	5.8 ± 0.5	7.7 ± 0.7	8
48	6.3 ± 0.2	6.7 ± 0.5	6.2 ± 0.1	5.4 ± 0.3	8
ANOVA	NS	NS	NS	NS	

Steady-state cell volumes were measured by videoplanimetric analysis as described in Materials and Methods and values represent the mean ± SEM of the average of triplicate determinations during the 3 min period immediately preceding the administration of 10 mM proline at each time point for all coverslips from each cell preparation. Maximum volume was measured 10-15 min after the administration of 10 mM proline and values represent the mean ± SEM of the average determination for all coverslips at each time point for each cell preparation. N thus represents the number of cell preparations, not the number of cells studied. There was a tendency for maximal cell volumes to decrease beyond 10 hr of cold storage with either UW or SLS solution but this failed to reach statistical significance. This tendency became significant if the 4 and 10 hr groups were not considered in the analysis.

Effect of cold preservation time and solution on proline-induced cell swelling :

For this set of experiments, we used a concentration of 10 mM proline which was found to yield an optimal initial cell swelling rate (see Figure 2.1). This concentration of proline was used in previous studies and was shown to induce a rapid, Na⁺-dependent increase in cell volume that reached a plateau within 5-10 minutes (6). In the same studies, an important impairment of proline-induced cell swelling rate was also observed after 24 hr of cold storage in U.W. solution (6). As presented in Table XIII, the maximum cell volume reached 15 minutes after administration of 10 mM proline had a tendency to decrease with cold preservation times exceeding 10 hours, in both U.W.- and SLS-stored cells, but this effect failed to reach statistical significance. On the other hand, the initial cell swelling rate triggered by 10 mM proline was gradually and significantly reduced as a function of cold storage time in either preservation solution ($p < 0.05$, Table XIV). This effect was statistically significant after storage times as small as 10hr in both U.W.- and SLS-preserved cells. Finally, cold storage in SLS solution afforded a slightly better preservation of proline-induced swelling rate than that in U.W. solution, this effect being statistically significant at the 24 hr time point.

Table XIV

Effect of Cold Preservation Time and Solution on the Initial Rate of Cell Swelling Induced by Concentrative Proline Uptake in Isolated Rat Hepatocytes

Hour	U.W.	SLS
0	0.170 ± 0.018	0.170 ± 0.018
4	0.164 ± 0.043	0.159 ± 0.022
10	0.148 ± 0.017*	0.155 ± 0.003*
24	0.093 ± 0.018*	0.121 ± 0.018*♣
48	0.074 ± 0.029*	0.083 ± 0.026*

Hepatocytes were isolated by collagenase perfusion, purified by Percoll gradient, suspended in cold U.W. or SLS solution and stored undisturbed for the indicated periods of time. Cells were then seeded onto Matrigel-coated glass coverslips and incubated at 37°C for 90 min prior to the measurement of cell volume by videoplanimetric analysis (see Materials and Methods). Values represent the Na⁺-dependent cell swelling rate in pL/min measured over the initial 60 sec after the addition of 10 mM proline and are expressed as the mean ± SEM of 6-8 separate cell isolations (volume measurements were made on 5-12 cells for each time point in each of these cell preparations).

Statistical significance between group means were analyzed by two-way analysis of variance for repeated measures;

* significantly different from unstored control (0 hours),

♣ significantly different from hepatocytes kept for 24hr in U.W. solution.

DISCUSSION

We have used a simple *in vitro* model of isolated rat hepatocytes submitted to cold storage and subsequently cultured at 37°C to compare the capacity of U.W. and of SLS solutions to maintain differentiated liver cell functions such as concentrative amino acid uptake. Indeed, our laboratory has recently shown that amino acids, such as proline, glutamine and alanine analogues, induce rapid Na⁺-dependent cell swelling (6) which reflects concentrative uptake of these model substrates by transport systems ASC, N and A, respectively (12). In the present study, we obtained a classical sigmoidal log (dose)-response relationship for proline-induced initial swelling rate with an EC50 value of 0.11 mM. This further establishes that videoplanimetric cell volume measurements provide an accurate and sensitive method by which to evaluate amino acid uptake, a differentiated hepatic function.

In previous studies, we also found that proline-induced cell swelling rate was very sensitive to cold preservation in U.W. solution, dropping by 50% within 24 hours of cold storage as compared with unstored controls (6). In the present work, we have examined earlier time points and found significant decreases in proline-induced cell swelling after preservation times of only 10 hours in U.W. solution. To our knowledge, this is the earliest expression of damage to a liver cell transport function that has been reported. It is interesting to note that our 10 hours time point corresponds well with the cold storage time of 12 hours found in clinical studies to represent a relative risk factor for poor transplantation prognosis (1). This reinforces the concept previously brought forward by our laboratory (6) to the effect that proline-induced cell swelling rate may be particularly

sensitive to cold preservation and rewarming conditions. The results of the present study therefore confirm that proline-induced cell swelling can serve as a sensitive index of hepatocellular function.

In this context, the present study clearly shows that cold preservation in SLS solution is as efficient, if not better, than U.W. solution in its capacity to maintain liver cell integrity and function. Since its development, the U.W. solution has contributed to extend the preservation of solid organs. It particularly increased the success of orthotopic liver transplantation (OLT). The U.W. solution was conceived by Belzer and colleagues (4) as a universal preservation solution with the following rationales :

- 1) Minimization of cell swelling by two impermeable agents, lactobionate and raffinose, and by an intracellular-like Na/K ratio (low Na, high K).
- 2) Prevention of extracellular space expansion by a colloid, hydroxyethyl starch (HES).
- 3) Prevention of intracellular acidosis by omitting glucose.
- 4) Minimization of free radicals with allopurinol and glutathione.
- 5) Facilitation of ATP resynthesis by the precursor adenosine.

However, many studies showed that several components of U.W. can be eliminated and its efficacy maintained for liver preservation, even if a high-sodium formulation is used (3,4). In fact, such studies demonstrated that the most important component of U.W. solution is lactobionate, an impermeable solute which effectively suppresses hypothermic cell swelling. Hence, a simpler variant called sodium-lactobionate-sucrose solution developed by Collins and co-workers yielded liver transplantation outcomes that were equivalent to that obtained with U.W. solution in the rat

model (3). The results of the present study support these data. Indeed, hypothermic storage in SLS solution afforded an equivalent maintenance of cell viability as compared to U.W. solution in our *in vitro* model of isolated and cultured rat hepatocytes. Similarly, the steady-state volume of surviving cells after rewarming was maintained equally well after hypothermic preservation in U.W. or SLS solutions. However, proline-induced initial swelling rate was slightly better preserved in hepatocytes stored in cold SLS than cold in U.W. solution. Our results therefore support the contention that several components of the U.W. solution may not provide any beneficial impact over and beyond the simple composition of the SLS solution.

Therefore, to improve the survival of liver grafts and the maintenance of efficient hepatic function, an interesting approach may thus be to use such a simple solution as SLS, to which pharmaceutical and cytochromeoprotective agents can be added. In this context, our study further demonstrates that *in vitro* models based on isolated liver cells represent a reliable and convenient research tool which can be used to screen for beneficial modifications to liver preservation solutions not only on the basis of cell survival, but most importantly on differentiated functions, such as their transport functions. This may ultimately lead to better liver preservation and hence to improved transplantation prognosis.

REFERENCE LIST

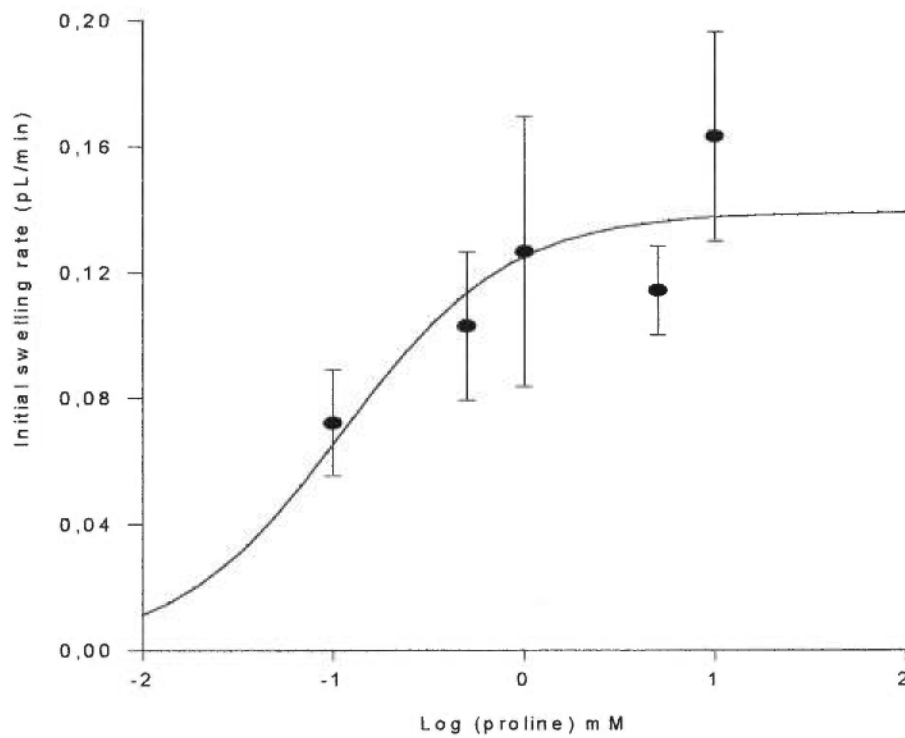
1. STRASBERG, S. M., HOWARD, T. K., MOLMENTI, E. P. and HERT, M. *"Selecting the donor liver: Risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation."* Hepatology. 1994 ; 20 : 829-838.
2. CLAVIEN, P.A., HARVEY, P.R.C. and STRASBER, S.M. *"Preservation and reperfusion injuries in liver allografts."* Transplantation , 1992 ; 53 : 957-978.
3. COLLINS, G.M. and WICOMB, W.N. *"New organ preservation solutions."* Kidney International. 1992 ; 42 : S-197—S-202.
4. SOUTHARD, J.H. and BELZER, F.O. *"The University of Wisconsin Organ Preservation Solution : Components, Comparisons, and Modifications."* Transplantation Reviews 1993 ; 7 : 176-190.
5. FORESTAL, D.A., HAIMOVICI, J. and HADDAD, P. *"Different effect of cold storage and rewarming on the urea pH regulating transporters in isolated rat hepatocytes."* Am. J. Physiol. 1997 ; 272 : G638-G645.
6. SERRAR, H. and HADDAD, P. *"Effects of cold preservation and rewarming on rat liver cell volume regulation and concentrative amino acid uptake."* Gastroenterology. 1997 ; 112 : 1344-1353.
7. KRISTENSEN, L.O. *"Associations between transports of alanine and cations across cell membrane in rat hepatocytes."* Am. J. Physiol. 1986 ; 251 : G575-G584.
8. BOYER, J.L., GRAF, J. and MEIER, P.J. *"Hepatic transport systems regulating pH_i, cell volume, and bile secretion."* Annu. Rev. Physiol. 1992 ; 54 : 415-438.

9. HAIMOVICI, J., BECK, J.S., VALLERAND, D., MOLLA-HOSSEINI, C. and HADDAD, P. *"Different modulation of hepatocellular Na⁺/H⁺ exchange activity by insulin and EGF."* Am. J. Physiol. 1994 ; 267 : G364-G370
10. BISSELL, D.M., ARENSON, D.M., MAHER, J.J. and ROLL, F.J. *"Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver."* J. Clin. Invest. 1987; 79: 801-812.
11. HADDAD, P., BECK, J.S., BOYER, J.L. and GRAF, J. *"Role of chloride ions in liver cell volume regulation."* Am .J. Physiol. 1991; 261: G340-G348.
12. MOSELEY, R.H. *"Hepatic uptake of amino acids."* In *Hepatic Transport and Bile Secretion : Physiology and Pathophysiology*, TAVOLONI, N. BERK, P.D. eds. New York, Raven Press, 1993. 337-349.

Legend to Figure 3.1

Effect of proline concentration on the initial swelling rate in isolated rat hepatocytes. Concentrative proline uptake was evaluated as the initial slope of the increase in cell volume observed upon administration of each concentration of proline. Cell volume was measured by videoplanimetric analysis of microscopic images as described in Materials and Methods. Results represent the mean \pm SEM from 4 different cell preparations.

Effect of proline concentration on the initial swelling rate in isolated rat hepatocytes

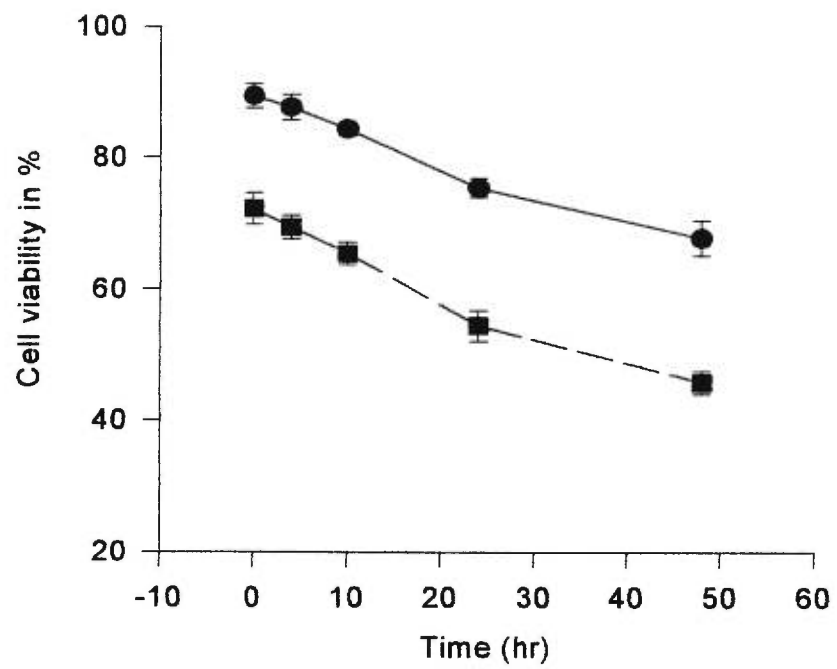


Legende to Figure 3.2

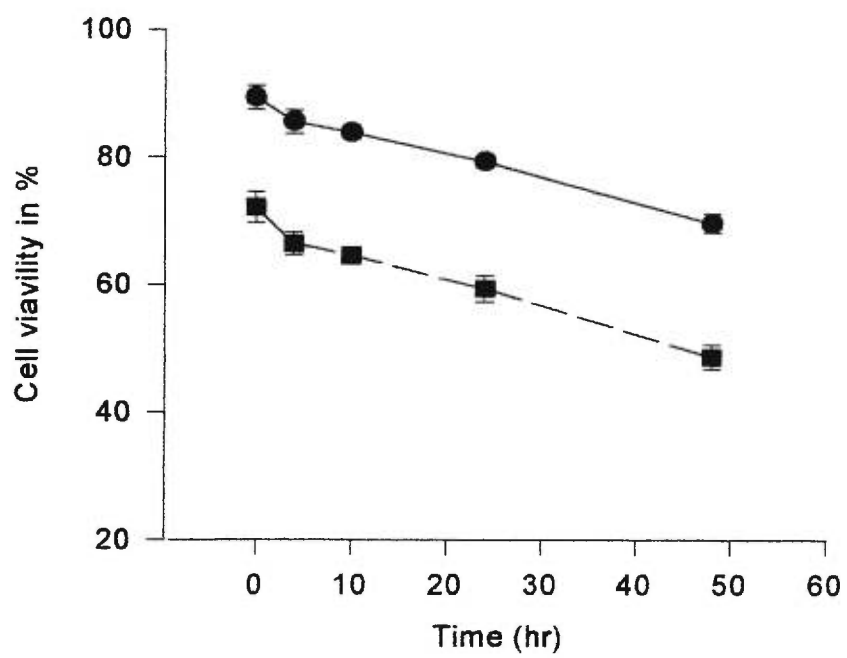
Effect of cold-preservation time and of rewarming on the viability of rat hepatocytes stored in University of Wisconsin (A) or Sodium-lactobionate-sucrose (B).

Cell viability was measured by the Trypan blue exclusion test. Viability was determined immediatly after cold storage (filled circles, straight lines) or after an additional period of 1-2 hr. of rewarming (filled squares, dotted lines) as described in Materials and Methods.

A



B



CHAPITRE 4

***CYTOCHROME P-450 CONTENT AND ACTIVITY
AFTER COLD STORAGE OF RAT HEPATOCYTES
IN UNIVERSITY OF WISCONSIN
AND SODIUM-LACTOBIONATE-SUCROSE SOLUTIONS***

Par

Halima SERRAR, Ayman EL-KADI, Patrick DU SOUICH et Pierre HADDAD

Publié en 1999 dans

Liver Transplantation and surgery. 5 (2) : 119-125

CYTOCHROME P-450 CONTENT AND ACTIVITY AFTER COLD STORAGE OF RAT HEPATOCYTES IN UNIVERSITY OF WISCONSIN AND SODIUM-LACTOBIONATE-SUCROSE SOLUTIONS

**Halima SERRAR^{1,2} Ayman EL-KADI²,
Patrick DU SOUICH² and Pierre HADDAD^{1,2}**

Grant Support

These studies were supported by a grant from the Medical Research Council of Canada (PG-11118 to P.H.). H.S. received a graduate studentship from the "*Groupe de recherche en transport membranaire*" made possible by an infrastructure grant from the "*Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec*". P.H. is a Senior Research Scholar of the "*Fonds de la Recherche en Santé du Québec*".

Running Title : Cytochrome P-450 in cold liver preservation

¹ Groupe de recherche en transport membranaire

² Département de pharmacologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, CANADA, H3C 3J7.

ABSTRACT

We compared the capacity of University of Wisconsin (U.W.) and of sodium-lactobionate-sucrose (SLS) hypothermic preservation solutions to maintain the integrity of the hepatic cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase system. Isolated rat hepatocytes were stored for 0, 10, 24 and 48 hours in U.W. or SLS solution and were subsequently cultured shortly at 37°C. Cell viability declined slightly but significantly in a time-dependent manner during cold preservation in either U.W. or SLS solution and warm culture exacerbated this effect. Total cytochrome P-450 declined gradually after cold preservation and warm culture to reach values 70 and 52% of unstored controls in cells preserved for 24 and 48 hours in cold U.W. solution, respectively. Storage in cold SLS solution yielded a similar decrease to 79 and 59% of unstored controls for the equivalent preservation times. Cytochrome P-450 activity was assessed by the metabolism of theophylline after various cold preservation times in U.W. or SLS solutions. Production of the major metabolite 1,3-dimethyluric acid was not significantly affected by extended cold preservation periods in either U.W. or SLS solutions. Similarly, the amount of residual theophylline remained stable in all groups suggesting that alternative metabolic routes were not modified. These studies show that cold preservation in SLS solution is as effective as that in U.W. solution in terms of cell viability, cytochrome P-450 content and activity towards theophylline. In addition, the significant reduction in cytochrome P-450 in conjunction with unaffected theophylline disposition suggests that certain cytochrome P-450 isoforms are specifically damaged by cold preservation and rewarming.

INTRODUCTION

In the last few years, liver transplantation has become an effective therapy for several end-stage liver diseases¹. Despite improvements in cold preservation solutions such as the commonly-used University of Wisconsin (U.W.) solution², initial graft non-function or dysfunction still remain problematic, accounting for 10 to 15% of liver graft failures¹. There is thus room for further improvements in preservation conditions, especially since one of the most important factors for poor transplantation prognosis remains prolonged cold storage time^{3, 4}. Many studies have evaluated the relevance of several empirically-derived components of the costly U.W. solution (Table XII) and the general consensus indicates that lactobionate is the key element to improve liver preservation as opposed to other organs like the heart, kidney or lung⁵. For instance, a much simpler sodium-lactobionate-sucrose (SLS) solution (Table XII) has yielded equivalent transplantation success^{5, 6}. Unlike other organs, transplantation injury in the liver is characterized by microcirculatory problems which are related mainly to the sensitivity of liver EC to cold preservation and rewarming^{1, 5, 7}. Morphologically, they show retraction of cytoplasm (rounding up) during cold preservation which progresses toward loss viability and denudation of the sinusoids after warm reperfusion⁷. Although hepatocytes appear to be the most resistant cell type to cold storage and rewarming according to morphological studies⁷, others including ourselves have shown that their metabolic and transport functions are perturbed⁸⁻¹⁰. Very little is known about injury to the hepatocytes and they are, in this manuscript, exploring one possible aspect of injury in hepatocytes.

Drug and xenobiotic metabolism by the cytochrome P-450-dependent hepatic monooxygenase system is among the most important physiological functions of the liver. Several studies have indicated that drug metabolising capacity is a suitable indicator of hepatic functional integrity after liver transplantation¹¹⁻¹³. Observed disturbances in liver metabolic integrity after cold preservation may further result in clinically relevant disturbances in drug handling, as seen particularly for immunosuppressive therapy¹⁴. It is therefore important to improve cold storage conditions in order to maintain not only a proper hepatocellular viability but also near-normal functions such as cytochrome P-450-dependent drug metabolism.

We have recently developed an *in vitro* model based on isolated rat hepatocytes to study perturbations of membrane transport functions after cold storage and warm culture, conditions which appropriately mimic transplantation^{9, 10}. Other laboratories have also demonstrated the pertinence and feasibility of such *in vitro* studies for the better understanding of the cellular mechanisms underlying hypothermic liver injury⁵. We therefore used our *in vitro* model to compare the efficacy of U.W. and SLS solutions in maintaining cytochrome P-450 content and its metabolic activity towards theophylline. We hereby report that cytochrome P-450 content decreases gradually and significantly within 24 hours after cold preservation, but that theophylline metabolism remains constant for up to 48 hours of hypothermic storage. Preservation in SLS solution is as efficient as that in U.W. solution in terms of cell viability, cytochrome P-450 content and theophylline metabolism.

MATERIALS AND METHODS

Cell isolation, preservation and short-term culture

Hepatocytes were isolated from the liver of fed male Sprague-Dawley rats weighting 150-200 g (Charles River, St-Constant, Quebec) by a variation of the classical collagenase perfusion as described previously¹⁵. Hepatocytes were purified by centrifugation on a Percoll gradient, and viability was assessed by exclusion of Trypan Blue (0.2%). The cells were then suspended in U.W. or SLS solution and kept at 4°C for periods of 10, 24 and 48 hours. Thereafter, U.W. or SLS was aspirated and the preserved cells resuspended in cold Williams' E medium for evaluation of cell viability by Trypan Blue exclusion. In a subset of experiments, cell viability was also measured after rewarming for 1-2 hours in Williams' E medium at 37°C. All experimental protocols were approved by the University Ethics Committee, and the animals were treated according to the guidelines of the Canadian Council on the Care of Laboratory Animals.

Cytochrome P-450 content and activity

Each well of 12-well plastic culture plates (Flacon, Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA) was coated with 600 µl of Type rat-tail collagen (50 µg/ml of acetic acid 0.02 N). One hour later, the wells were rinsed with deionized water and washed once with serum-free Williams' E medium. Hepatocytes were added at a density of 4×10^6 cells/ml in Williams' E medium equilibrated at 37°C and supplemented with 10% calf serum and insulin 1 µM. The plastic culture plates were then placed at 37°C in a humidifier with 95% O₂ and 5% CO₂. The total amount of cytochrome P-450 was

measured in microsomes by spectrometric method of Omura and Sato¹⁶ in the hepatocytes after a 4 hour incubation period in all groups.

The catalytic activity of hepatocellular cytochrome P-450 was assessed in all groups by measuring the concentration of theophylline metabolites generated after a 4 hours incubation period. Theophylline was selected because it is metabolised by several P-450 isoforms¹⁷⁻¹⁹, and that allows to monitor different isoenzymes of the P-450. Theophylline was dissolved in serum-free Williams' E medium and 50 μ l were added to each well containing the hepatocytes to reach a final concentration of 176 μ M. At time 0, 350 μ l of the supernatant were collected from each well (control sample) and following 4 hours of incubation, the remaining incubation media was collected and frozen at -20°C until theophylline and its metabolites were assayed using HPLC as previously described²⁰. The protein content for each well was always assessed before and after the incubation period using the method of Lowry et al.²¹.

Data analysis and statistics

Results were analysed by two-way ANOVA for repeated measures and the significance of pairwise comparisons evaluated using the Sigma Stat software (Jandel Scientific, San Rafael, CA). Results are presented as the mean \pm SEM and N represents the number of cell preparations (animals). Differences between group means were deemed significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Cell viability

Table XV presents the viability of isolated rat hepatocytes as evaluated by Trypan Blue exclusion after 0 (unstored controls) to 48 hours of cold storage in U.W. or SLS solution. Both solutions afforded the maintenance of an appropriate cell viability after prolonged cold storage and only approximately 10% more cells took up the vital dye after 48 hours of hypothermic storage as compared to unstored controls ($p < 0.05$, see Table XV). As observed previously in our laboratory⁹, rewarming for 1-2 hours in Williams' E medium subsequent to cold storage in U.W. solution caused an additional and significant decrease in cell viability of 15 to 20% at all time points ($p < 0.05$), showing that the storage time-dependent decline remained similar in amplitude (NS for interaction between storage time and cold/rewarming factors). Hypothermic preservation in SLS solution yielded results identical to those observed in U.W. solution (see Table XV).

Cytochrome P-450 content

Figure 4.1 shows the total cytochrome P-450 content of isolated rat hepatocytes submitted to variable periods of cold preservation in U.W. or SLS solution followed by rewarming by short-term culture at 37°C in Williams' E medium. As can be seen, cytochrome P-450 content decreased gradually as a function of cold storage time, this decline becoming statistically significant within 24 hours for both U.W.- and SLS-stored cells ($p < 0.05$). There was a tendency for cytochrome P-450 levels to be higher in SLS- than in U.W.-stored cells after 24 and 48 hours of cold preservation but this effect did not reach statistical significance ($p = 0.37$ for interaction between time and storage solution).

Table XV.

Effect of cold storage time in U.W. or SLS solutions on cell viability before
and after rewarming

Time in solution U.W.			Time in solution SLS		
Cell viability (%)			Cell viability (%)		
Hours	After cold storage	After rewarming	After cold storage	After rewarming	N
0	86.2 ± 1.5	71.6 ± 1.8 ^b	86.2 ± 1.5	71.6 ± 1.8 ^b	6
10	83.2 ± 1.2 ^a	67.5 ± 1.1 ^{a,b}	83.5 ± 1.1 ^a	66.5 ± 0.9 ^{a,b}	6
24	79.4 ± 2.3 ^a	60.8 ± 2.0 ^{a,b}	80.5 ± 1.9 ^a	62.1 ± 1.1 ^{a,b}	6
48	74.7 ± 1.8 ^a	55.7 ± 1.6 ^{a,b}	75.5 ± 1.5 ^a	54.3 ± 1.3 ^{a,b}	6

Cell viability was measured by the Trypan Blue exclusion test after simple cold storage in U.W. or SLS solution and after a rewarming period of 1-2 hours in Williams' E medium at 37°C, as described in Materials and Methods.

^a Significantly different from corresponding unstored control (0 hr.) in same preservation solution.

^b Significantly different from corresponding time of simple cold storage in same preservation solution.

Interaction between preservation time and cold/rewarming conditions for either solution, as well as interaction between time and preservation solution for either condition, were not statistically significant.

Theophylline metabolism

The incubation of theophylline with isolated rat hepatocytes yielded only 1,3-dimethyluric acid (1,3-DMU) in all experimental groups. Figure 4.2 presents the effect of cold preservation time on the metabolism of theophylline to 1,3-DMU in cells maintained in U.W. or SLS solution prior to warm culture. Production of 1,3-DMU remained stable in all U.W.-stored cells irrespective of the cold preservation time preceding short-term warm culture (NS, Figure 4.2). Similarly, the concentration of theophylline remaining in the culture medium was found to be unaffected by the duration of cold preservation prior to warm culture (NS, Figure 4.3). Storage of cells in SLS solution yielded results fully comparable to those of U.W.-stored cells (NS for preservation time and versus U.W. solution, Figure 4.2 and Figure 4.3).

DISCUSSION

Cytochrome P450-dependent drug metabolism is a vital function carried out mainly by the liver. Such drug-metabolizing activity can be compromised after liver transplantation and several studies suggest that it may serve as a good index of early graft function¹¹⁻¹³. This may have an important impact on the health of the transplanted patient as evidenced, for instance, by an increased toxicity of immunosuppressants due to decreased metabolism¹⁴. Alterations in the activity of the hepatic cytochrome P450-dependent mono-oxygenase system would also be expected to perturb the metabolism of several other xenobiotics as well as endogenous substrates like bile acids and certain steroid hormones²². This, in turn, could contribute to the unacceptably high incidence of initial graft poor function or non-function attributed to «transplantation injury».

Although cold preservation/reperfusion injury in the liver affects primarily endothelial cells, damage to hépatocytes is present but much less understood.

We have thus compared two preservation solutions the UW and SLS solutions, for their capacity to maintain the integrity of the hepatic cytochrome P450 mono-oxygenase system in conditions of cold preservation and warm culture, which mimic *in vitro* the two major stages of liver transplantation^{9, 10} In previous studies, we have defined the disturbances that occur to hepatocellular volume⁹ and pH¹⁰ regulatory mechanisms after cold preservation and warm culture. The present studies confirmed that prolonged cold preservation in UW solution affords the maintenance of a good cell viability in the cold since three quarters of cells still excluded the vital dye after 48hr. On the other hand, subsequent warm culture, which mimicks warm reperfusion, induces a further 15 to 20% loss of cell viability at all preservation times. These two stages of cytotoxicity correspond to the results obtained for non parenchymal cells in the isolated perfused rat liver⁷ and reflects the two major stages of transplantation injury in humans¹. In the present study, we have found that cold storage in SLS solution affords as good a preservation of gross cell viability as does UW solution, whether during simple cold storage or after rewarming.

Our results further indicate that the hepatocellular total content of cytochrome P450 content remains unaffected after 10 hr. of cold preservation followed by rewarming, but becomes significantly reduced within 24 hr. of cold storage. These results are similar to those recently presented by Olinga et al. in isolated rat hepatocytes²³ and by Izuishi et al. in the isolated perfused rat liver model²⁴, both using the UW solution for cold

preservation. The former group reported that the loss in total cytochrome P450 was statistically significant after 24 but not after 48 hr. in UW solution. The fact they used suspensions of Wistar rat hepatocytes and Krebs Henseleit buffer for the rewarming phase may explain their different results. On the other hand, our results are in agreement with those of Izuishi et al. who observed drops of total cytochrome P450 of 22 and 37% in the Sprague-Dawley rat isolated perfused liver model after 24 and 48 hr. of cold storage and 1 hr. warm reperfusion, respectively. In the present study we observed reductions of 29 and 48% as compared to unstored controls for the equivalent respective time points and preservation solution. In this context, it is noteworthy that cold storage in SLS solution was equivalent to that in UW solution in its capacity to preserve total hepatocellular content of cytochrome P450.

To evaluate the metabolic capacity of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system, theophylline was selected because it is metabolized by several isoforms of cytochrome P450 (CYP). For instance, theophylline 8-hydroxylation is catalyzed by CYP 1A2, 2D6, 2E1 and 3A4 yielding 1,3-DMU as the major metabolite¹⁹. In our studies, the production of 1,3-DMU was not significantly influenced by prolonged cold storage for up to 48 hr. in UW solution. This contrasts with the previously reported impairment of theophylline elimination by hypoxia²⁵, and suggests that damages caused by cold preservation and rewarming are not simply the result of the expected hypoxia during prolonged cold storage. The fact that the total amount of cytochrome P450 was reduced by nearly 50% in cells stored for 48 hr., whereas the formation of 1,3-DMU

remained unchanged, indicates that cold preservation and rewarming may selectively affect certain cytochrome P450 isoforms and not others. Moreover, our results suggest that other metabolic routes of theophylline were not impaired by our experimental protocol since the concentration of intact theophylline remaining at the end of the incubation period was similar at all preservation time points. Our data is consistent with several reports showing that the activity of different drug metabolizing enzymes is maintained after prolonged cold storage in UW solution. For instance, in the isolated perfused rat liver p-nitroanisole O-demethylase and aniline p-hydroxylase activities were preserved²⁴. Similarly, in isolated rat hepatocytes, 7-ethoxycoumarin and lidocaine metabolism remained unchanged²³. On the other hand, aminopyrine N-demethylase activity was found to be decreased in the isolated perfused rat liver²⁴. In addition, other reports have shown significant reductions in CYP 3A in both animal²⁶ and human¹⁴ liver tissue submitted to cold preservation and rewarming. As mentioned above, this brings forth the interesting possibility that only selected cytochrome P450 isoforms are sensitive to transplantation injury. Considering the principal isoforms known to metabolize theophylline and to carry out the other metabolic activities found by others to be unaffected, we can propose the hypothesis that liver isoforms of the 2B family may be particularly sensitive to transplantation injury. Indeed, apoenzymes of the 2B family are known to be abundant in the rat liver and could account for the dramatic reductions in total cytochrome P450 content observed in isolated cultured hepatocytes (this study) and in the isolated perfused rat liver²⁴. Alternatively our results could relate to the phylogenetic redundancy of the cytochrome P-450 system. It may take more significant

decrease in cytochrome P-450 before any decrease in theophylline metabolism, or metabolism of other compounds is noted.

However, it is noteworthy to mention that membrane transport proteins involved in hepatocellular volume and pH homeostasis were recently found to present a selective sensitivity to cold preservation and rewarming²⁷. Thus, further experimentation will be required to ascertain that similar selective sensitivities exist for cytochrome P450 isoforms.

Finally, our data clearly demonstrated that cold storage in SLS solution yielded equivalent results to that in UW solution in terms of gross cell viability, of total cytochrome P450 content and of theophylline metabolism. This shows that the SLS solution, a simpler variant of the UW solution, is sufficient to obtain the preservative effects of the original empirically-designed formula² at the level of these parameters of cytochromeity and drug metabolism. Improvements may thus build on this simple solution and our model may be useful to test the impact of various additives for their beneficial effect on several hepatocellular functions, particularly membrane transport and drug metabolism.

REFERENCE LIST

1. CLAVIEN, P.A., HARVEY, P.R.C. and STRASBER, S.M. *"Preservation and reperfusion injuries in liver allografts."* Transplantation. 1992 ; 53 : 957-978.
2. BELZER, F.O. and SOUTHARD, J.H. *"Principles of solid organ preservation by cold storage."* Transplantation. 1988 ; 45 : 673-676.
3. STRASBERG, S.M., HOWARD, T.K., MOLMENTI, E. P. and HERTL, M. *"Selecting the donor liver: Risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation."* Hepatology. 1994 ;20 : 829-838.
4. PLOEG, R.J., D'ALESSANDRO, A.M., KNETCHTLE, S.J., STEGALL, M.D., PIRSCH, J.D., HOFFMAN, R.M., SASAKI, T., SOLLINGER, H.W., BELZER, F.O. and KAYALOGLY, M. *"Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation - a multivariate analysis."* Transplantation. 1993 ; 55: 807-813.
5. SOUTHARD, J.H. and BELZER, F.O. *"The University of Wisconsin Organ Preservation Solution : Components, Comparisons, and Modifications."* Transplantation Reviews. 1993 ; 7 : 176-190.
6. COLLINS, G.M. and WICOMB, W.N. *"New organ preservation solutions."* Kidney International. 1992 ; 42 : S-197—S-202. 20.
7. CALWELL-KENKEL, J.C., CURRIN, R.T., TANAKA, Y., THURMAN, R.G. and LEMASTERS, J.J. *"Küppfer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers : effects of reperfusion."* Hepatology. 1991 ; 13 : 83-95.

8. VREUGDENHIL, P.K., MARSH, D.C., BLEZER, F.O. and SOUTHARD, J.H. "*Urea and protein synthesis in cold –preserved isolated rat hepatocytes.*" *Hepatology.* 1992 ; 16 : 241-246.
9. SERRAR, and H. HADDAD, P. "*Effects of cold preservation and rewarming on rat liver cell volume regulation and concentrative amino acid uptake.*" *Gastroenterology.* 1997 ; 112 : 1344-1353.
10. FORESTAL, D.A., HAIMOVICI, J. and HADDAD, P. "*Different effect of cold storage and rewarming on the urea pH regulating transporters in isolated rat hepatocytes.*" *Am. J. Physiol.* 1997 ; 272 : G638-G645.
11. OAKLAND, C.D.H., HICKMAN, R. and TERBLANCHE, J. "*The aminopyrine breath test predicts the outcome of hepatic transplantation in pigs.*" *Hepatology.* 1989 ; 9 : 602-605.
12. BALDERSON, G.A., POTTER, J.M., HICKMAN, P.E., CHEN, Y., LYNCH, S.V., and STRONG, R.W. "*MEGX as a test of donor liver function.*" *Transplant. Proc.* 1992 ; 24 : 1960-1961
13. NAGEL, R.A., DIRIX, L.Y., HAYLLAR, K.M., PREISIG, R., TREDGER, J.M. and WILLIAMS, R. "*Use of quantitative liver function tests – caffeine clearance and galactose elimination capacity – after orthotopic liver transplantation.*" *J. Hepatology.* 1989 ; 10 : 149-157.
14. AZOULAY, D., LEMOINE, A., DENNISON, A., GRIES, J.M., DOLIZY, I., BARBAZZA, F., BONHOMME, L., BEAUNE, P. and BISMUTH, H. "*Relationship between cytochrome P-450 3A content of orthotopically transplanted liver and postoperative morbidity.*" *Transplant. Proc.* 25 ; 1993 : 2630-2631.

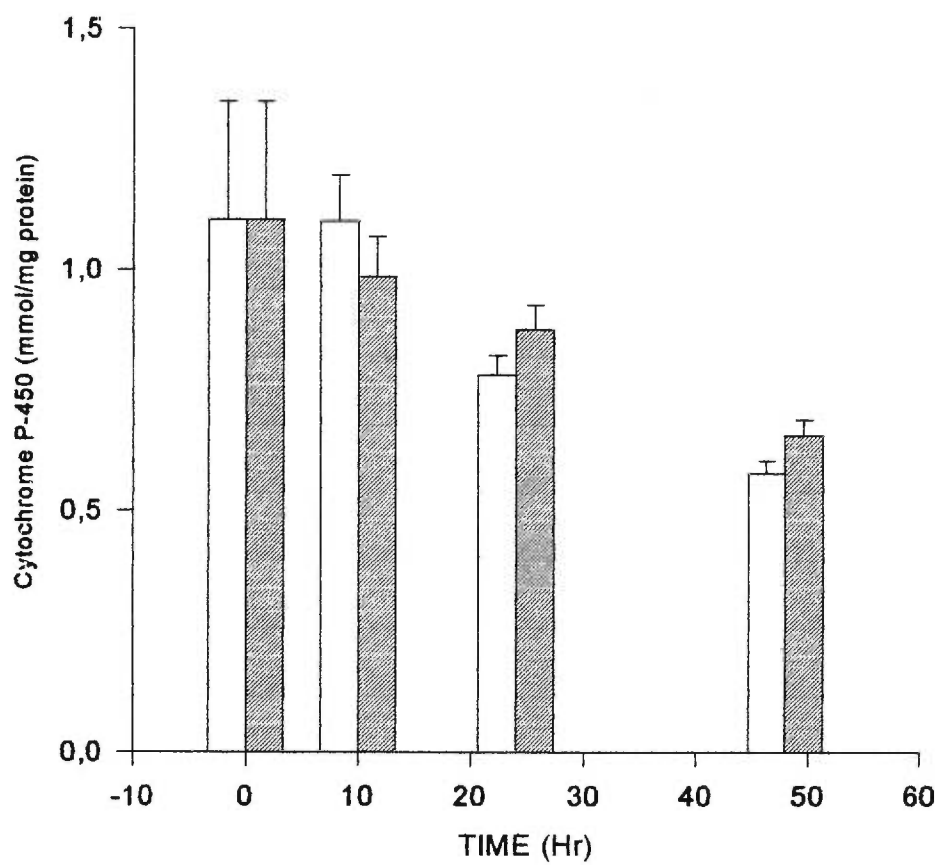
15. HAIMOVICI, J., BECK, J.S., VALLERAND, D., MOLLA-HOSSEINI, C. and HADDAD, P. *"Different modulation of hepatocellular Na⁺/H⁺ exchange activity by insulin and EGF."* Am. J. Physiol. 1994 ; 267 : G364-G370
16. OMURA, T., and SATO, R. *"The carbon-monoxide-binding pigment of liver microsomes."* J. Biol. Chem. 1964 ; 239 : 2370-2378.
17. SARKAR, M.A. and JACKSON, M.B. *"Theophylline demethylations as probes for P-4501A1 and P-4501A2."* Drug Metab. Dispos. 1994 ; 22 : 827-834.
18. HA, H.R., CHEN, J., FREIBURGHaus, A.U. and FOLLI, F. *"Metabolism of theophylline by cDNA-expressed human cytochrome P-450."* Br. J. Clin. Pharmacol. 1995 ; 39 : 321-326.
19. ZHANG, Z.Y. and KAMINSKY, L.S. *"Characterisation of human cytochrome P-450 involved in theophylline 8-hydroxylation."* Biochem. Pharmacol. 1995 ; 50 : 205-211.
20. DU SOUICH, P., HOEN, B., SAUNIER, C., HARTEMANN, D., SAUTEGEAU, A., CORNETTE, A., DELORME, N., POLU, J.M. and SADOUL, P. *"Blood gas disturbances and theophylline disposition in patients with COLD with and without hypoxemia."* Chest. 1989 ; 95 : 1028-1032.
21. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. *"Protein measurement with the Folin phenol reagent."* J. Biol. Chem. 1951 ; 193 : 265-275.
22. GUENGERICH, P. *"Cytochrome P450 structure, mechanism and biochemistry."* Human cytochrome P450 enzymes, in Ortiz de Montellano PR (ed). Plenum Press, New York. 1995 ; 423-535.

23. OLINGA, P., MEREMA, M., SLOOFF, M.J.H., MEIJER, D.K.F. and GROOTHUIS, G.M.M. *"Influence of 48 hours of cold storage in University of Wisconsin organ preservation solution on metabolic capacity of rat hepatocytes."* J. Hepatology. 1997 ; 27 : 738-743.
24. IZUSHI, K., ICHIKAWA, Y., HOSSAIN, M.A., MAEBA, T., MAETA, H. and TANAKA, S. *"Effects of cold preservation and reperfusion on microsomal cytochrome P-450 linked monooxygenase system of the rat liver."* J. Surg. Res. 1996 ; 61 : 361-366.
25. NAKATSU, K. *"Limitation of theophylline elimination by reduced oxygen availability in mouse hepatocytes and rat isolated livers."* Can. J. Physiol. Pharmacol. 1984 ; 63 : 903.
26. WIELAN, D.E., SCHÜTZ, E., ARMSTRONG, V.W., KÜTTER, F., HELLER, C., and OELLERICH, M. *"Idebenone protects hepatic microsomes against oxygen radical-mediated damage in organ preservation solutions."* Transplantation. 1995 ; 60 : 444-451.
27. HADDAD, P., NOËL, J., VADNAIS, J., MATHÉ, L., and VALLERAND, D. *"Cold preservation and rewarming modulate the expression of membrane transport proteins involved in liver cell pH and volume regulation."* Hepatology. 1997 ; 26 : 353A (Abstract).

Legend to Figure 4.1

Isolated rat hepatocytes were submitted to the indicated periods of cold storage in U.W. (open bars) or SLS (shaded bars) solutions prior to short-term culture at 37°C. Total amount of cytochrome P-450 was measured by a spectrophotometric method as described in Materials and Methods. Statistical significance between group means was analysed by two-way repeated measures ANOVA. * Significantly different from respective unstored control (time = 0). There was no significant effect of preservation solution or any interaction between preservation time and solution.

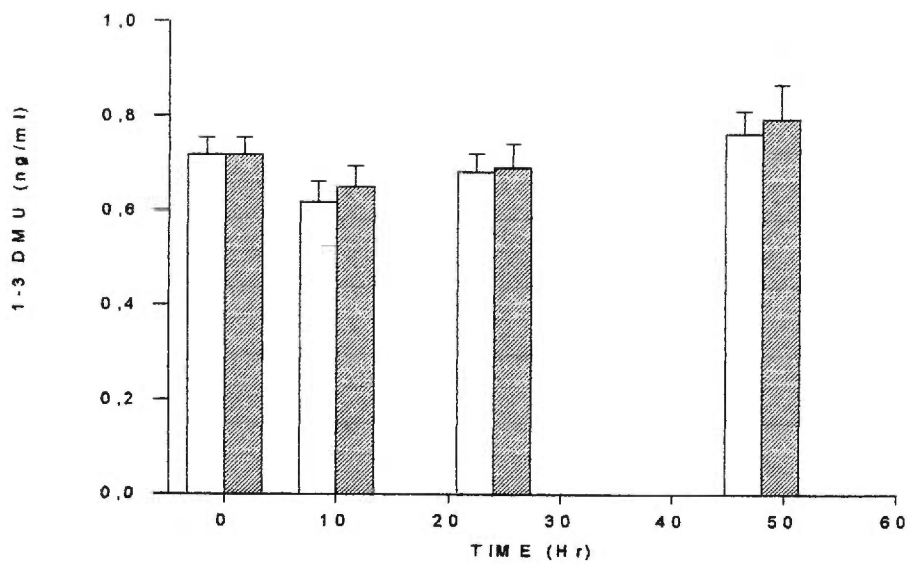
Effect of hepatocyte preservation in U.W. or SLS solutions for variable time periods
on the total cellular content in cytochrome P-450



Legend to Figure 4.2

Isolated rat hepatocytes were submitted to the indicated periods of cold storage in U.W. (open bars) or SLS (shaded bars) solutions prior to short-term culture at 37°C. Cells were then incubated with 176 μ M theophylline for 4 hr and the metabolite 1,3-dimethyluric acid detected by HPLC as described in Materials and Methods.

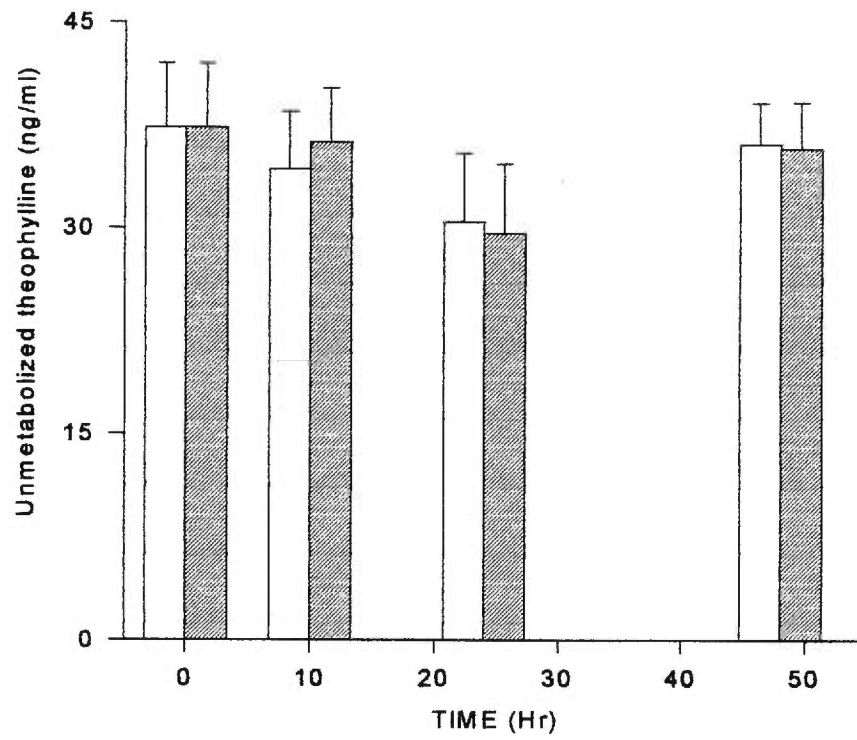
Effect of hepatocyte preservation in U.W. or SLS solutions for variable time periods on the metabolism of theophylline to 1,3-dimethyluric acid



Legend to Figure 4.3

Isolated rat hepatocytes were submitted to the indicated periods of cold storage in U.W. (open bars) or SLS (shaded bars) solutions prior to short-term culture at 37°C. Cells were then incubated with 176 μ M theophylline for 4 hr and the remaining unmetabolized theophylline detected by HPLC as described in Materials and Methods.

Effect of hepatocyte preservation in U.W. or SLS solutions for variable time periods on the concentration of unmetabolized theophylline



CHAPITRE 5

DISCUSSION

5.1. EFFET DE LA PRÉSERVATION À FROID (4 °C) ET LE RÉCHAUFFEMENT (37 °C) SUR LES MÉCANISMES DE LA RÉGULATION DU VOLUME APRÈS A UN CHOC HYPOTONIQUE SUIVIE D'UNE PHASE D'HYPERTONICITÉ RELATIVE

Les dommages de l'ischémie froide et la reperfusion à chaud constituent la cause principale du dysfonctionnement primaire (PDF) ou de la non-fonction primaire (NFP) des greffes (Strasberg et coll., 1994 ; Clavien et coll., 1992) et ceci est un facteur déterminant pour le mauvais pronostic de la transplantation du foie (Marsh et coll., 1990). Un temps de préservation d'organe dans la solution U.W. supérieur à 30 heures est considéré comme étant un facteur de risque absolu, alors qu'une période de préservation entre 15 et 24 heures dans la même solution est considérée comme un risque relatif pour le dysfonctionnement primaire. Notre étude a pour but de mieux connaître les perturbations cellulaires causées par le temps de préservation à froid qui sont associées au dysfonctionnement primaire menant à un échec de la transplantation du foie. Ceci devrait apporter de nouvelles voies pour prolonger le temps de préservation par amélioration de la composition de la solution de préservation.

Pour une transplantation efficace, le foie doit être entreposé dans le froid pour la période qui sépare le prélèvement de l'organe chez le donneur de celle de son emplacement chez le receveur. Les dommages causés par la transplantation peuvent être le résultat de cette hypothermie prolongé suivie d'une reperfusion à chaud. La solution de préservation U.W. a été développée en partie pour limiter le gonflement causé par l'ischémie froide (Southard et Belzer, 1995). Cependant, des études morphologiques ont démontré que les cellules du foie augmentent de volume et présentent une altération membranaire après une préservation à froid dans U.W., suivie de réchauffement (Marsh

et coll., 1989). Une des hypothèses les plus répandues pour expliquer, au moins en partie la NFP et le dysfonctionnement des organes à greffer, concerne la perturbation du volume homéostatique (Marsh et coll., 1989 ; Sumimoto et coll., 1992).

La régulation du volume cellulaire est un élément important puisque la préservation à froid inhibe l'activité de la pompe Na^+/K^+ ATPase. Ceci va réduire la distribution des ions et par conséquent provoquera un gonflement des cellules du foie (Van Rossum et Russo, 1984). L'augmentation du volume cellulaire peut en retour causer la rupture de la membrane plasmique et compromettre sérieusement la viabilité des cellules. Ceci a été mis en évidence dans les modèles *in vitro* par la libération de lactate déshydrogénase (LDH) (Marsh et coll., 1989) et *in vivo* par l'augmentation dans le sang des transaminases d'origine hépatique (Carles et coll., 1994).

D'autre part, il est devenu évident que les changements de volume cellulaire peuvent influencer le métabolisme des hépatocytes et participer aux effets détériorants de la préservation à froid suivie du réchauffement des greffes du foie. Plusieurs laboratoires ont vérifié l'impact des conditions semblables à la transplantation sur certaines fonctions des hépatocytes (Vreugdenhill et coll., 1992 ; Sandker, 1992 ; Marsh et coll., 1990). Cependant aucune étude n'a examiné les mécanismes de régulation du volume dans les cellules hépatiques soumises à des conditions semblables à la transplantation hépatique.

Le premier but de ces présentes expériences était de vérifier l'effet de la préservation à froid et de la reperfusion à chaud sur les mécanismes de régulation du volume des cellules parenchymateuses du foie de rat préservées pour des périodes de

temps prolongés dans la solution U.W. et ensuite mises en culture pour une période courte dans un milieu chaud, suite à un choc hypotonique.

Nos résultats montrent clairement qu'une préservation prolongée dans la solution U.W. altère graduellement la capacité des cellules parenchymateuses du foie à contrer un stimulus osmotique induisant un gonflement (DCV) ou un rétrécissement (ACV). D'autres part la viabilité cellulaire à froid diminue légèrement mais significativement et ce dès 24 heures de préservation. De même, le réchauffement (c'est-à-dire après une incubation à 37° C des hépatocytes) accentue grandement le nombre des cellules non-viables. Sur le plan morphologique, une plus grande proportion d'hépatocytes isolés montre une rupture des membranes ou des boursouffures survenant suite à un choc hypotonique après un temps de préservation excédant 24 heures. Cependant, même les cellules les plus résistantes au choc osmotique ont montré une diminution significative du taux de DCV et de l'ACV après 24 et 48 heures de préservation de manière respective.

Les mécanismes responsables de la détérioration de la régulation du volume cellulaire suite à un choc hypotonique, observée après une préservation à froid dans la solution U.W. suivie de réchauffement, ne sont pas encore complètement élucidés. Par contre une étude faite en parallèle dans notre laboratoire sur l'effet de la préservation à froid et le réchauffement sur les mécanismes de régulations du pH, a récemment prouvé que l'activité de l'échangeur Na^+/H^+ est diminuée graduellement et significativement après 24 heures de préservation à froid dans la solution U.W. suivie de réchauffement, au contraire l'activité de l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ et du co-transporteur $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ est inchangée (Forestal et coll., 1997).

De plus, des études récentes en collaboration avec le laboratoire de Josette Noel, ont montré clairement que le contenu membranaire de l'isoforme NHE1, de l'échangeur Na^+/H^+ (Bookstein et coll., 1994 ; Noël et Pouysségur, 1995) est diminué en fonction du temps de préservation et ce dès 24 heures de préservation (Haddad et coll., 1997). Cette dégradation s'est essentiellement produite pendant la préservation à froid, ce qui est en accord avec les travaux de Calmus et coll. (1995) qui ont observé une protéolyse lors de la préservation dans la solution U.W.. D'autre part, l'expression de la pompe Na^+/K^+ ATPase est fortement diminuée après une période supérieure à 24 heures de préservation suivie d'une reperfusion à chaud. Par contre, le GLUT 2 isoforme du transport de glucose, utilisé comme contrôle, en raison de son abondance dans les membranes basolatérales des hépatocytes de rat (Pessin et Bell, 1992), est demeuré intact après une préservation à froid suivie ou non de reperfusion à chaud (Haddad et coll., 1997).

Comme mentionné précédemment (1.2.1.a), l'ACV des hépatocytes soumis à un choc hypertonique relatif, procède par la stimulation des échangeurs Na^+/H^+ et $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ qui s'accompagne d'une augmentation de l'activité de la pompe Na^+/K^+ ATPase. Ainsi, l'expression réduite de l'échangeur Na^+/H^+ et de la pompe Na^+/K^+ ATPase retrouvée dans les cellules du foie soumises à une préservation à froid dans la solution U.W. suivie de réchauffement, apporte une explication de la réduction de l'ACV observée dans les mêmes conditions suite à un choc hypertonique relatif. Ces résultats montrent clairement que le contenu membranaire hépatique en protéines de certains transporteurs impliqués dans la régulation du volume et du pH cellulaire sont affectés spécifiquement et différemment par le temps de préservation à froid dans la solution U.W. suivie d'un réchauffement.

Par ailleurs, nos résultats obtenus avec des temps de préservation inférieurs à 24 heures (4 et 10 heures) (Tableau XVI), montrent que la diminution de la viabilité cellulaire précède celle de la perte de régulation du volume cellulaire (Serrar et Haddad, 1995). Ceci suggère que la détérioration de l'ACV et de la DCV ne puisse être la première cause de la mort cellulaire. Il faut cependant noter que la méthode de mesure de volume que nous utilisons sélectionne les cellules les plus résistantes (bordure des cellules intactes et pas de boursouflures). Ainsi, nous sous-estimons la sévérité des perturbations des mécanismes de la régulation du volume suite à un choc osmotique.

5.2 . EFFET DE LA PRÉSERVATION À FROID (4 °C) ET LE RÉCHAUFFEMENT (37 °C) SUR LE GONFLEMENT CELLULAIRE INDUIT PAR L'ENTRÉE DES ACIDES AMINÉS Na^+ DÉPENDANTS :

Même si les chocs osmotiques sont utiles pour l'étude des mécanismes de régulation du volume ils ne sont pas physiologiques pour le foie (Chwalbinska-Moneta, 1979). Par contre l'accumulation des acides aminés correspond à une situation réelle et physiologique qui provoque un stress osmotique entraînant un gonflement des hépatocytes (Kristensen, 1986). Ceci est pertinent dans le contexte de la transplantation hépatique, puisqu'une fois l'organe mis en place chez le receveur, il est en contact direct avec le sang portal qui est très riche en acides aminés, alors qu'auparavant l'organe se trouve dans une solution dépourvue d'acides aminés. Ce changement de milieu pourrait représenter un stress osmotique réel et physiologique. Par conséquent, ce gonflement cellulaire induit par les acides aminés peut avoir une grande influence sur les fonctions métaboliques après une transplantation. C'est pour cette raison que nous avons vérifié

Tableau XVI.

Effet de la préservation à froid (4° C) et du réchauffement (37° C)
sur la viabilité et le mécanisme de régulation du volume cellulaire
à des temps précoces

Temps préservation Hr	Viabilité à Froid	DCV	ACV
0	86.5 ± 1.41	0.173 ± 0.018	0.077 ± 0.021
4	82.3 ± 1.36	0.168 ± 0.001	0.082 ± 0.014
10	80.4 ± 1.38*	0.165 ± 0.017	0.078 ± 0.016
ANOVA	P<0.05	0.939	0.896

l'effet de la solution U.W. et du temps de préservation sur le gonflement induit par l'accumulation des acides aminés Na^+ dépendants.

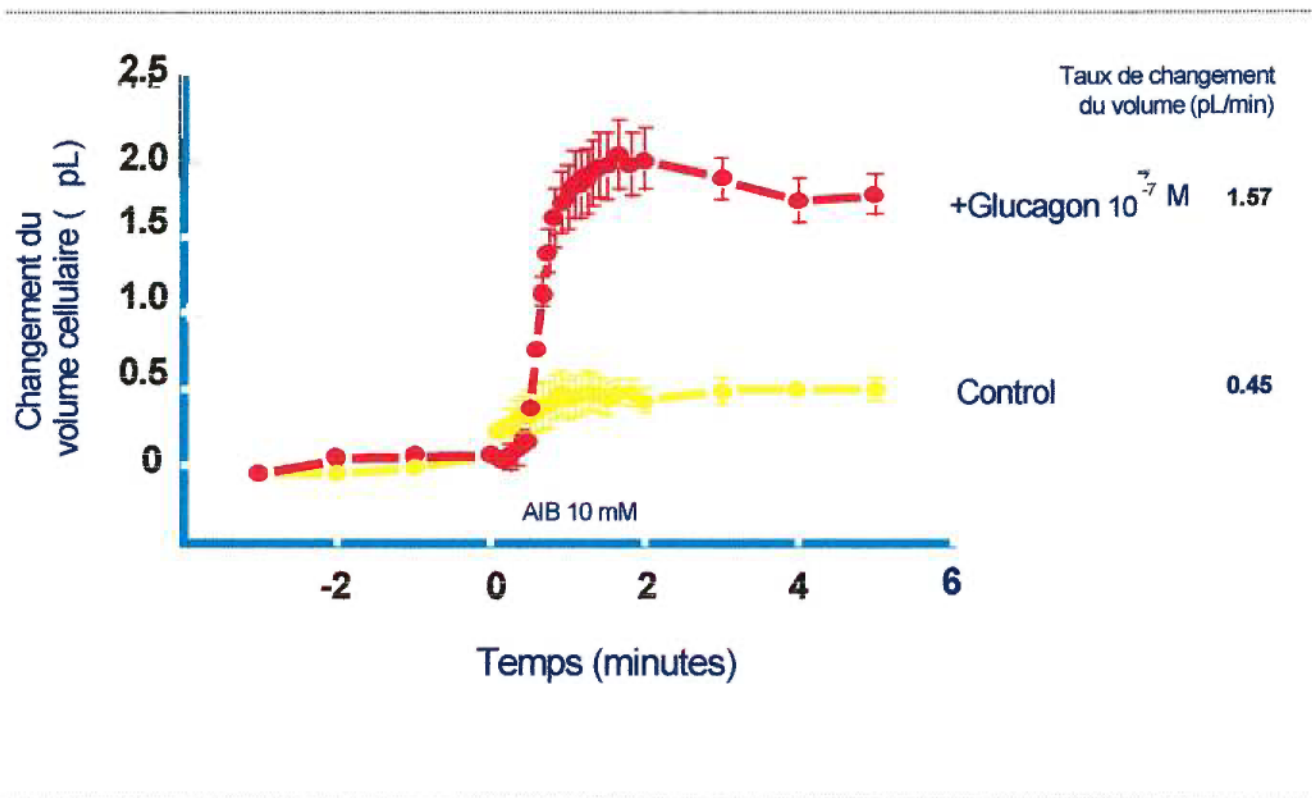
Seulement les transporteurs d'acides aminés Na^+ dépendants peuvent contribuer à l'accumulation intracellulaire de ceux-ci et donc au gonflement cellulaire. Les plus notables sont :

- ◆ les systèmes A (Kristensen, 1990 ; Edmonson et Lumeng, 1980),
- ◆ le système ASC (Kristensen, 1990 ; Kilberg et coll., 1979) et
- ◆ le système N (Kilberg et coll., 1980) spécifique au foie.

Dans cette étude, les acides aminés utilisés étaient l'AIB, la proline et la glutamine substrats spécifiques du système A (Kristensen, 1990), ASC (Kilberg et coll., 1980) et N (Tamarappo et coll., 1992) respectivement. Nos résultats ont clairement montré que l'accumulation des acides aminés provoque un gonflement rapide des cellules et que ceci dépend de la présence du Na^+ extracellulaire. De plus, le volume se stabilise entre 5 et 10 minutes après l'administration de l'acide aminé tel qu'attendu par la cinétique du transport à la concentration saturable de 10 mM utilisée. La rapidité et la précision des mesures vidéoplanimétriques nous a profité pour mesurer le volume et suivre le gonflement cellulaire provoqué par l'entrée de l'AIB, la glutamine et la proline dans les hépatocytes en fonction du temps de préservation. De plus nous avons trouvé que le prétraitement des hépatocytes pour 30 minutes avec 100 nM glucagon, un des stimulateurs hormonaux les plus puissants de transport du système A (Moseley, 1993 ; Kristensen, 1990), cause un gonflement cellulaire plus rapide et plus important que celui provoqué par l'AIB (Figure 5.1).

Figure 5.1

Effet du glucagon sur le système A Na⁺ dépendant



Dans ce contexte nos résultats montrent que la préservation à froid des hépatocytes dans la solution U.W. suivie de réchauffement (incubation à 37°C), n'affecte pas l'accumulation de l'AIB et de la glutamine et ce jusqu'à une période de 48 heures. Par contre, 72 heures de préservation semble néfaste pour tous les systèmes de transport Na⁺-dépendant testés. Ceci suggère que le système de transport A et N pour lesquels l'AIB et la glutamine sont des substrats préférentiels peuvent être résistants aux conditions de la transplantation *in vitro* jusqu'à une période de 48 heures.

Le maintien de l'accumulation de l'AIB et de la glutamine en conjonction avec les détériorations observées au niveau des mécanismes de régulation du volume hépatocellulaire après préservation prolongée, pourrait mettre le greffon dans une situation précaire quand la circulation est rétablie chez le receveur. En effet, vu l'affaiblissement des mécanismes de régulation du volume cellulaire, nous prévoyons un temps plus long pour neutraliser un gonflement si le foie est entreposé pour une longue période dans la solution U.W.. Le changement de volume produit par l'entrée des acides aminés a été de l'ordre de 8 % comparé à 20 % suite à un choc hypotonique. Par conséquent, la diminution compensatrice (DCV) suite à un gonflement induit par l'entrée des acides aminés sera plus lente que celle observée en réponse à un stress hypotonique. Même s'ils ne sont pas nécessairement cytotoxiques, de tels changements chroniques de volume (même de l'ordre induit par les acides aminés) peuvent exercer une influence profonde sur le métabolisme hépatocellulaire et pourraient donc perturber sérieusement les fonctions hépatiques (Haeussinger et Lang, 1991 ; Baquet et coll., 1990 ; Meijer, 1992). Le danger devient particulièrement important quand le patient est mis sous alimentation parentérale. En effet, une solution intraveineuse telle que l'Hépatamine, est souvent appliquée après la

chirurgie de la transplantation hépatique. Cette solution contient une haute concentration en acides aminés comme l'alanine et la glutamine dont les systèmes d'entrée sont bien préservés après la préservation à froid suivie de réchauffement. Une fois que le foie est transplanté, il doit faire face aux demandes métaboliques du receveur qui incluent la captation d'acides aminés. Ceci pourrait mener au gonflement chronique des cellules parenchymateuses, qui peut être responsable des perturbations des fonctions métaboliques des cellules du foie. Ceci peut participer au dysfonctionnement primaire observé dans 15% des cas à l'échec de la transplantation hépatique.

Contrairement à l'entrée de l'AIB et de la proline, la préservation à froid des hépatocytes dans la U.W. altère rapidement et dramatiquement le taux d'entrée de proline, qui diminue de 50% après seulement 24 heures. Le gonflement provoqué par la proline peut donc être considéré comme un bon indice de l'intégrité fonctionnelle du foie après une préservation à froid suivie de réchauffement.

Même si nos résultats montrent clairement une diminution du taux d'entrée de proline en fonction du temps de préservation à froid, les implications physiologiques du système de transport ASC dans ces conditions sont difficiles à évaluer, car d'autres systèmes peuvent aussi transporter la proline (Moseley, 1993 ; Kristensen, 1990). Des études de transport plus classiques utilisant des acides aminés radioactifs sont nécessaires pour clarifier ce point. Ces résultats associés avec ceux de la DCV, de l'ACV et du pH cellulaire nous indiquent fortement que la préservation à froid et le réchauffement ne modifient pas toutes les fonctions hépatocellulaires de la même façon et avec un même décours temporel.

5.3. COMPARAISON DE DEUX SOLUTIONS DE PRÉSERVATION : LA SOLUTION DE L'UNIVERSITÉ DE WISCONSIN (U.W.) ET LA SOLUTION SODIUM-LACTOBINATE-SUCROSE (SLS)

La solution Euro-Collins a été utilisée dans plusieurs centres de transplantation, ce qui a permis une préservation hypothermique du foie d'une durée de 6 à 10 heures (Collins et Wicomb, 1992). Vingt ans plus tard, Belzer et Southard (1988) ont développé une solution de préservation à l'Université de Wisconsin qui a remplacé la EC. La solution U.W. a contribué à prolonger la préservation d'organes (12 à 24 heures) et à augmenter le taux de succès de la transplantation hépatique (Southard et Belzer, 1993). Malgré cette amélioration, il y a encore une grande proportion de greffes qui montrent une PDF et PNF (Strasberg et coll., 1994 ; Clavien et coll., 1992) qui contribue au taux de mortalité de 15-20 % dans la première année suivant la greffe du foie. (Clavien et coll., 1992). Pour cette raison, il est encore important de développer de meilleures conditions de la transplantation hépatique particulièrement en améliorant la composition des solutions de préservation.

Plusieurs laboratoires ont déjà élucidé l'utilité de différents composants de la solution U.W. dans des modèles animaux. (Southard et Belzer, 1993 ; Collins et Wicomb, 1992). Le succès de la transplantation hépatique dans des modèles d'animaux est un test inévitable pour confirmer les changements bénéfiques de la composition des solutions de préservation. Il est aussi important de développer des modèles simples, rapides, fiables et peu coûteux afin d'évaluer et de mesurer ces changements. Dans ce contexte, les cellules hépatiques isolées représentent une avenue intéressante. Toutefois, les études faites jusqu'à ce jour ont porté surtout sur les indices généraux de l'intégrité du foie telle que la perte d'enzymes

cytosoliques ou la chute de la viabilité cellulaire. Cependant peu d'études ont examiné l'effet des conditions de transplantation hépatique sur les fonctions différenciées des cellules du foie.

Dans ce dernier chapitre nous avons comparé deux solutions de préservation, soit la solution U.W. et la solution SLS, sur une fonction différenciée des cellules isolées du foie et sur le métabolisme des médicaments. La solution U.W. est universelle et commercialisée chez Dupont. Par contre la solution SLS, nous l'avons tout simplement préparée dans notre laboratoire à coût très réduit.

La solution U.W. contient différents composants dont le but était de minimiser le gonflement cellulaire (agents : lactobionate, raffinose, et par ratio $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ (basse Na^+ , haut K^+), de prévenir l'expansion de l'espace intracellulaire ou extracellulaire (colloïde hydroxyéthyle starch), de prévenir l'acidose intracellulaire (l'omission du glucose), de minimiser les radicaux libres (l'allopurinol et glutathion) et de faciliter la resynthèse de l'ATP (le précurseur adénosine). Le reste des composants se trouve dans tous les milieux de culture (Southard et Belzer, 1993).

Par contre la solution SLS (variante simple de la solution U.W.) est surtout à base de sucrose, de lactobionate et de sodium. D'où son appellation anglophone de "Sodium Lactobinate Sucrose (SLS) solution."

5.3.1. Effet de la préservation à froid et du réchauffement sur le gonflement cellulaire induit par l'entrée de proline Na⁺ dépendante

Nous avons mentionné plus haut que le taux de gonflement induit par la proline, substrat spécifique du système ASC (Moseley, 1993), est très sensible à la préservation à froid dans la solution U.W., chutant de 50 % après 24 heures de préservation comparée avec le contrôle sans préservation, en opposition à la glutamine ou à l'analogue de l'alanine (Serrar et Haddad, 1997).

Ceci nous a conduit à proposer que le gonflement induit par la captation de proline peut représenter un index fonctionnel sensible de l'intégrité des cellules du foie. Le but de cette étude était de comparer l'efficacité des solutions U.W. et SLS à conserver les fonctions de transport de proline par la mesure de changements de volume induits par cet acide aminé.

Dans cette étude nous avons obtenu une relation log (dose-réponse) classique sigmoïde pour le taux de gonflement initial induit par la proline avec une valeur de EC50 de 0.11mM. Cela établit davantage que les mesures de volume par la technique de vidéoplanimétrie est une méthode précise et sensible qui permet d'évaluer l'entrée des acides aminés, fonction différenciée des cellules hépatiques (Serrar et Haddad, 1997).

Nous avons examiné à des temps précoces de préservation (4-10 heures) et nous avons trouvé une diminution significative du gonflement cellulaire induit par la proline après des temps de préservation de seulement 10 heures dans la solution U.W.. Donc, ces résultats renforcent le concept mentionné précédemment que le taux de gonflement induit par la

proline peut être particulièrement sensible à la préservation à froid et aux conditions du réchauffement et peut servir d'index des fonctions différenciées des hépatocytes.

A notre connaissance, il s'agit d'un indice fonctionnel précoce des dommages de fonctions de transport des cellules du foie dans les mêmes conditions. Il est intéressant de noter qu'une période de 10 heures correspond bien au temps de préservation à froid (12 heures) trouvé en clinique comme un facteur de risque relatif pour le mauvais pronostic de la transplantation (Strasberg et coll., 1994).

Tel que mentionné, plusieurs études ont montré que les différents composants de la solution U.W. peuvent être éliminés de la solution U.W. et son efficacité de préservation des cellules du foie restera la même. Cependant un des composants le plus important pour une bonne préservation est le lactobionate, un anion imperméant qui supprime le gonflement hypothermique. Finalement, le retour à une formule haute en sodium (concentrations de Na^+ de K^+ extracellulaires plus normales), est un avantage pour la préservation à froid des organes, car il minimise les dommages d'hyperkaliémie observés avec la solution U.W. (Collins et Wicomb, 1992 ; Southard et Blezer, 1993).

Les résultats de notre étude supporte ces données. Dans ce contexte cette étude montre que la préservation à froid dans la solution SLS est aussi efficace sinon meilleure que la solution U.W. dans sa capacité à maintenir l'intégrité cellulaire et les fonctions du foie. En effet la préservation hypothermique de la solution SLS a maintenu une viabilité cellulaire équivalente à celle de la solution U.W. dans notre modèle *in vitro* d'hépatocytes de rat isolés et mis en culture. De la même façon le volume à l'équilibre des cellules survivantes après le réchauffement est resté stable peu importe la période de

préservation hypothermique dans la solution U.W. ou SLS. De plus le taux de gonflement initial induit par la proline était préservé légèrement mieux par la solution SLS que par la solution U.W.. Nos résultats supportent donc que certaines composantes de la solution U.W. ne puissent apporter aucun impact bénéfique comparé à la solution SLS à composition simple.

5.3.2. Effet de la préservation à froid et la reperfusion à chaud sur l'intégrité du système mono-oxygénase dépendant du cytochrome P-450

Le métabolisme des médicaments par le système mono-oxygénase dépendant du cytochrome P-450, est une fonction physiologique importante du foie. L'activité métabolique des médicaments peut être compromise suite à une transplantation hépatique (Oakland et coll., 1989 ; Nagel et coll., 1989). En effet, plusieurs études suggèrent que ceci puisse servir d'indice de l'intégrité fonctionnelle hépatique dans le premier temps de la greffe (Izuishi et coll., 1996). L'observation des perturbations de l'intégrité métabolique après une préservation à froid suivie de réchauffement, peut résulter des perturbations cliniques de l'utilisation adéquate des médicaments, particulièrement pour le traitement immunosuppresseurs (Azoulay et coll., 1993). Ces perturbations peuvent avoir un impact important sur la santé du receveur. Cela a été prouvé par l'augmentation de la toxicité d'immunosuppresseurs causée par une diminution du métabolisme hépatique (Oakland et coll., 1989 ; Nagel et coll., 1989). L'altération de l'activité hépatique du système mono-oxygénase cytochrome P-450 prévoit aussi l'altération du métabolisme de plusieurs autres xénobiotiques et aussi des substrats endogènes tels que les acides biliaires et

certaines hormones stéroïdes. Ceci en retour pourrait contribuer au rejet initial non-fonctionnel et au mauvais fonctionnement des greffons.

Malgré les grands progrès apportés à la transplantation hépatique par le développement de la nouvelle solution par Belzer la U.W., il y a encore place à d'autres améliorations. Il est important d'améliorer les conditions de préservations de façon à maintenir non seulement une bonne viabilité cellulaire, mais aussi les fonctions normales tel que le métabolisme des médicaments dépendant du cytochrome P-450. D'autant plus qu'un patient ayant une transplantation reçoit une médication à vie.

Nous avons donc comparé la solution U.W. avec la solution SLS dans leur capacité à conserver l'intégrité du système cytochrome P-450 dans les conditions de préservation à froid suivi d'une culture à chaud, ce qui imite *in vitro* les deux étapes majeures de la transplantation hépatique. Cette étude confirme qu'une préservation à froid prolongée dans la solution U.W. procure la préservation d'une bonne viabilité cellulaire, tandis que la culture à chaud (37°C) qui suit, reproduisant le réchauffement, induit une plus grande perte de la viabilité 15-20 % pour tous les temps de préservation. Ces deux étapes de cytotoxicité correspondent aux résultats obtenus dans la perfusion des cellules de rat (Calwell-Kenkel et coll., 1991) et reflètent les deux étapes majeures causant des dommages lors de la transplantation hépatique chez les humains (Clavien et coll., 1992). Nos résultats indiquent que la quantité totale du cytochrome P-450 demeure non-affectée après 10 heures de préservation à froid suivie de réchauffement, mais réduit significativement après 24 heures de préservation à froid. Ces résultats sont similaires à ceux récemment présentés par Olinga et coll. (1997) dans les hépatocytes de rat isolés et

par Izuishi et coll. (1996) utilisant tous deux la préservation à froid dans la solution U.W.. Ce groupe a rapporté que la perte de la quantité totale du cytochrome P-450 était statistiquement significative après 24 heures et non après 48 heures dans la solution U.W.. Le fait qu'ils aient utilisé la suspension des hépatocytes de rat « Wistar » et le tampon « buffer Kerbs Hensleit » pour la phase de réchauffement, ceci pourrait expliquer ces différents résultats. D'autres part nos résultats concordent avec ceux de Izuishi et coll. (1996), qui ont observé une chute significative de la quantité totale du cytochrome P-450 à 22-37 % (avec un modèle du foie isolé de rat « Sprague Dawley ») après 24 et 48 heures de préservation à froid respectivement et une heure de reperfusion à chaud. Parallèlement dans les mêmes conditions nous avons observé une réduction de 29 et 48 % de la quantité totale du cytochrome P-450. Dans ce contexte, il est à noter que la préservation à froid dans la solution SLS était équivalent à la solution U.W. concernant la préservation du contenu total du cytochrome P-450 dans les hépatocytes.

Afin d'évaluer la capacité métabolique du système mono-oxygénase dépendant du cytochrome P-450, la théophylline a été choisie parce qu'elle est métabolisable par plusieurs isoformes, par exemple la théophylline 8-hydroxylation est catalysée par CYP 1A2, 1D6, 2E1 et 3A4 aboutissant au 1,3-DMU comme métabolite majeur (Zhang et Kaminsky, 1995). Dans nos études, la production de 1,3-DMU n'a pas été influencée significativement par la préservation à froid prolongée pour plus de 48 heures dans la solution U.W.. Le fait que la quantité totale du cytochrome P-450 soit réduite de 50 % alors que la formation de 1,3-DMU est restée stable, indique que la préservation à froid peut affecter sélectivement certains isoenzymes du cytochrome P-450 et pas d'autres. De plus nos résultats suggèrent que d'autres voies métaboliques de la théophylline ne soient

pas affectées par le protocole expérimental, puisque la concentration de théophylline non-métabolisable (restée intacte à la fin de l'incubation) était similaire à tous les points de temps de préservation. Nos données sont en accord avec plusieurs rapports mentionnant que l'activité métabolique des médicaments est maintenue après entreposage prolongé à froid dans la solution U.W., tel que le métabolisme de *p*-nitroanisole-O-déméthylase et aniline *p*-hydroxylase (Izuishi et coll., 1996) ou 7-ethoxycoumarin et lidocaïne (Olinga et coll., 1997).

D'autres part, l'activité de l'aminopyrine N-déméthylase a été trouvée diminuée dans les mêmes conditions (Izuishi et coll., 1996). De plus d'autres rapports ont montré une diminution significative de CYP 3A autant dans les tissus des animaux (Wielan et coll., 1995) que dans ceux des humains (Azoulay et coll., 1993) soumis à une préservation à froid suivie de réchauffement. Ceci apporte la possibilité que seuls certains isoformes de cytochrome P-450 sont sensibles aux dommages causés par la transplantation hépatique. Considérant que les principaux isoenzymes connues pour métaboliser la théophylline et d'autres pour supporter d'autres activités métaboliques non-affectées, on peut avancer l'hypothèse que les apoenzymes du foie de la famille 2B peuvent être particulièrement sensibles aux dommages de la transplantation hépatique. En effet, les isoenzymes de la famille 2B sont connues pour être abondants dans le foie de rat et pourraient être responsables de la réduction dramatique de la quantité totale du cytochrome P-450 observé dans la culture d'hépatocytes isolés (dans cette étude) et dans le foie de rat perfusé (Izuishi et coll., 1996). Alternativement nos résultats peuvent être reliés à la redondance du système cytochrome P-450. Il est possible qu'une réduction plus significative du cytochrome P-450

soit nécessaire avant de constater toute diminution dans le métabolisme de la théophylline ou le métabolisme de d'autres médicaments.

Toutefois, d'autres expériences seront nécessaires pour certifier que cette sensibilité sélective existe pour les isoenzymes du cytochrome P-450.

Dans cette étude nous avons trouvé que la préservation à froid dans la solution SLS procure une préservation aussi efficace que la solution U.W. concernant la viabilité cellulaire, la quantité totale du cytochrome P-450, la quantité non-métabolisable de la théophylline et le métabolite majeur de la théophylline, autant après une préservation à froid qu'après réchauffement.

CHAPITRE 6

CONCLUSION

Notre rapport montre que les hépatocytes préservés à froid dans la solution U.W. sont résistants au stress hypothermique et montrent des taux de régulation de volume plus bas pour le gonflement (DCV) ou le rétrécissement (ACV) induit osmotiquement, et des taux de régulations de pH plus bas face à l'acidification (échangeur Na^+/H^+). L'expression réduite de l'échangeur Na^+/H^+ et de la pompe Na^+/K^+ ATPase apporte l'explication de l'altération de l'ACV suite à une préservation à chaud suivie de réchauffement. Ceci peut rendre les cellules parenchymateuses plus amorphes à répondre à des stimulus physiologiques de gonflement, tels que l'accumulation des acides aminés spécialement concernant les demandes métaboliques du receveur et une nutrition parentérale riche en acides aminés. Cette modération, mais prolongée du gonflement cellulaire, peut perturber l'équilibre métabolique de l'hépatocyte.

Des études cliniques ont montré qu'une période de préservation supérieure à 30 heures dans la solution U.W. représente un facteur de risque absolu de mauvais pronostic de la transplantation hépatique (Ploeg et coll., 1993 ; Strasberg et coll., 1994). Ceci correspond au temps où le pH et les mécanismes de régulations sont altérés (Serrar et Haddad, 1997 ; Forestal et coll., 1997). Nos résultats amènent donc un aperçu sur les fonctions des mécanismes de régulation du volume des hépatocytes après une préservation à froid suivie de réchauffement et supportent la notion que l'altération du volume homéostatique peut participer au mauvais pronostic de la transplantation hépatique, spécialement pour les organes préservés à froid dans la solution U.W. pour des longues périodes.

Finalement nos données démontrent clairement que la préservation à froid des hépatocytes dans la solution SLS donne des résultats équivalents à ceux de la solution U.W. dans ces capacités à maintenir de la viabilité cellulaire, l'intégrité fonctionnelle des cellules du foie et le métabolisme des médicaments. Ceci suggère que la solution SLS, qui n'est qu'une variante simple de la solution U.W., est suffisante pour obtenir les effets bénéfiques de préservation de la solution élaborée expérimentalement (Belzer et Southard, 1988). Donc les différents composants de la solution U.W. ne peuvent apporter aucun impact bénéfique comparé à la solution SLS à composition beaucoup plus simple. Une approche intéressante pourrait être établie sur une solution aussi simple que la SLS à laquelle des agents pharmacologiques et cytoprotecteurs peuvent être ajoutés. Ceci permettra de maintenir l'efficacité des fonctions hépatiques et améliorer la survie des greffes du foie, menant ainsi à un meilleur pronostic de la transplantation hépatique.

Dans ce contexte notre modèle *in vitro* basé sur les cellules du foie isolées représente un outil de recherche. En effet, ce modèle bien contrôlé n'est soumis à aucune influence hormonale, ni interaction cellulaire. De plus, il est fiable car nos résultats correspondent aux études antérieures qui ont observé :

- Une diminution de la viabilité cellulaire dans ces deux phases ; après la préservation à froid et le réchauffement.
- Un gonflement cellulaire chronique (activité de la DCV diminuée, les systèmes de transport A et N maintenus).
- Une acidification du milieu intracellulaire (activité de l'ACV est diminuée, expression de l'échangeur Na^+/H^+ et de la pompe Na^+/K^+ ATPase est réduite).

D'autres part la méthode de vidéoplanimétrie pour la mesure du volume, permet une résolution temporelle et spatiale précise. De plus cette technique permet une évaluation précoce (10 heures) de l'altération du gonflement induit par l'entrée des acides aminés Na⁺ dépendants. Le point le plus important de cette étude, est que cette altération est la plus précoce d'une fonction différenciée des cellules du foie dans les conditions de la transplantation hépatique qui a être rapportée jusqu'à présent dans la littérature. Il est intéressant de noter que 10 heures correspond plus au moins au facteur de risque relatif (12 heures) de dysfonctionnement primaire responsable de l'échec de la transplantation hépatique en clinique. (Ploeg et coll., 1993 ; Strasberg et coll., 1994).

Il est évident que d'autres études avec des foies de rat perfusés pour une transplantation seraient nécessaires pour rendre ce travail significatif pour les découvertes des transplantations du foie. Il est toutefois justifiable et profitable de continuer des études *in vitro* puisque de telles méthodes représentent un outil utile, peu coûteux et rapide pour comprendre davantage les mécanismes associés à un dysfonctionnement des hépatocytes après une préservation à froid suivie de réchauffement. Une fois un parallélisme établi entre les organes et les modèle *in vivo*, notre modèle *in vitro* et notre technique de mesure de volume pourrait aussi servir pour analyser les effets bénéfiques des modifications des solutions de préservation non seulement sur la survie des cellules, mais aussi sur les fonctions différenciées hépatiques incluant le transport membranaire et le métabolisme des médicaments, qui sera susceptible d'améliorer le taux de succès de la transplantation hépatique menant ainsi à un meilleur pronostic.

CHAPITRE 7

PERSPECTIVES D'AVENIR

Les phénomènes biochimiques hépatiques sont complexes, et comme décrit par J. Sarles et F. Giraud :

“Le foie est un carrefour où se mêlent toutes les grandes voies métaboliques de synthèse, de transformation, de stockage et de catabolismes. Tous ces mécanismes chimiques sont sous la dépendance d’enzymes, de transporteurs, et de récepteurs représentant plusieurs milliers de protéines.”

Donc l'équivalent du rein artificiel ou de pompe cardiaque prothétique extra ou intracorporelle apparaît comme un objectif hors d'atteinte même si certains travaux d'approche sont proposés (Demetriou, 1991).

⊗ Cependant deux directions de recherches sont prometteuses.

7.1. AGENTS PHARMACOLOGIQUES

De nombreuses études basées sur les connaissances physiopathologiques actuelles sont dignes d'intérêt. En effet l'ajout des agents pharmacologiques utiles dans la solution de préservation permettra d'améliorer la transplantation hépatique.

7.1.1. Substances nutritives (Adénosine-Fructose)

La suppression de l'oxygène durant l'ischémie provoque une chute précoce du métabolisme des nucléotides comme l'adénosine. Ainsi, plusieurs études expérimentales ont porté sur les bienfaits d'ajouter dans les solutions de préservation de l'adénosine ou des composés comme l'ATP-MgCl₂. Rappelons que cette substance nutritive a été ajoutée à la solution U.W. avec beaucoup de succès (Southard et Belzer, 1993).

D'autres études, ont rapporté que de hautes concentrations de fructose préviennent les dommages de l'anoxie sur les cellules du foie (Brass et coll., 1993 ; Zeid et coll., 1997 ; Gasbarrini et coll., 1992 ; Lefebvre et coll., 1994). Ceci est expliqué par le fait que le fructose améliore la production de l'ATP glycolytique (Brass et coll., 1993) et stimule la glycolyse et la formation de lactate qui protège la cellule contre les méfaits de l'anoxie (Anundi et et coll, 1987 ; Younes et coll., 1987 ; Anundi et De Groot, 1989). Une autre étude a montré que le fructose inhibe la libération des radicaux libres (Anundi et De Groot, 1989), inhibe l'accumulation de Ca^{2+} (Younes et Strubelt, 1988), bloque l'influx du Ca^{2+} (Gasbarrini et coll., 1992) et enfin diminue la libération de LDH ce qui réduit la perte de la viabilité produite par l'ischémie (Brass et coll., 1993). En résumé le fructose protège la cellule des différents méfaits de l'ischémie prolongée.

7.1.2. Inhibiteurs calciques

L'importance de l'utilité des inhibiteurs calciques en transplantation hépatique est double. En effet, certains auteurs les ont utilisés pour diminuer l'entrée de Ca_2^+ à l'intérieur de la cellule suite à une ischémie, d'autant plus l'accumulation intracellulaire de Ca_2^+ participe aux dégâts membranaires et au gonflement cellulaire. Il semble que l'efficacité maximale des inhibiteurs calciques est liée au fait qu'ils soient donnés précocement, c'est-à-dire chez le donneur d'organe ou au moins dans la solution de préservation et durant la phase post-ischémique, car si les lésions membranaires sont importantes les inhibiteurs calciques seront inefficaces puisque la pénétration du Ca_2^+ à l'intérieur de la cellule n'est pas spécifique et ne dépend plus des seuls canaux calciques. Des études cliniques confirment l'intérêt de ces substances en transplantation rénale pour diminuer l'incidence de NTA. D'autres part, les

inhibiteurs calciques sont de puissants vaso-dilatateurs (Goldfarb et coll., 1983 ; Rodicio et coll., 1990 ; Shapiro et coll., 1985).

7.1.3. Inhibiteurs de protéase

Les protéases sont liées aux membranes. Elles sont aussi considérées comme étant la cause possible de la perte de l'activité des systèmes reliés au cytochrome P-450. Takei et coll. (1990) rapportent que la fonction métabolique du foie après la transplantation est améliorée en utilisant des inhibiteurs de protéase, la leupeptine et la pepstaine A.

7.1.4. Acides aminées

L'autre grand intérêt en transplantation, est la glycine. Cette dernière est un acide aminé glucoplastique, substrat important dans plusieurs processus biochimiques tels que la biosynthèse de la créatinine, la porphyrine, les purines et le métabolisme des médicaments. La glycine est connue comme un agent cytoprotecteur contre les dommages de l'hypoxie au niveau du tubule proximal rénal du lapin (Weinberg et coll., 1987 ; 1989), les cellules isolées du rein de rat (Brezis et coll., 1984), les cellules du foie de rat *in situ* et *in vitro* (Okuda et coll., 1992) et les cellules humaines endothéliales (Weinberg et coll., 1992). Une autre étude a montré que l'activation de la phospholipase A2 et l'oxyde nitrique synthase n'est pas affectée après ajout de la glycine (Wetzels et coll., 1993). Il a été suggéré par la même équipe, que la glycine (à des concentrations plasmatiques 220 uM), est un protecteur par inhibition de l'activité de protéase.

En résumé, la glycine (toxicité relativement faible), le fructose et les inhibiteurs calciques et de protéase, sont des antidotes contre les dommages induits par l'hypoxie et

la réoxygénation dans le foie de rat isolé. Nous suggérons d'ajouter ces agents dans les solutions de préservation pour prévenir et minimiser les dommages de l'hypoxie et de la réoxygénation lors de la transplantation hépatique.

7.2. THÉRAPEUTIQUE GÉNIQUE

Par exemple, on sait qu'une maladie génétique, la mucoviscidose, est provoquée dans 80 % des cas par la disparition d'un seul acide aminé, soit la phénylalanine en position 508 dans la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulation) codée par chromosome 7. Cette protéine ne peut alors réguler l'entrée du chlore dans les cellules, d'où une diminution de l'eau dans les sécrétions et la viscosité accrue de celle-ci. Si le diagnostic de la maladie peut être fait *in utero*, on peut envisager, dans un avenir plus ou moins lointain, de faire transporter un gène défectif par un virus inoffensif.

RÉFÉRENCES

- ANUNDI, I. and DE GROOT, H. *"Total protection from hypoxic liver damage by fructose."* Am. J. Physiol. 257 : G58-G64, 1989.
- ANUNDI, I., KING, J., OWENS, D.A., SCHNEIDER, H., LEMASTERS, J.J. and THURMAN, R.G. *"Fructose prevents hypoxic cell death in liver."* Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 55 : 111-116, 1987.
- ANDERSON, K.E., PANTUK E, E.J., CONNEY, A.H. and KAPPAS, A. *"Nutrient regulation of chemical metabolism in humans."* Fed. Proc. 44 : 130-133, 1985.
- ARNOLD, P.E., VAN PUTTEN, V.J., LUMLERTGUL, D., BURK, T.J. and SCHRIER R.W. *"Adenine nucleotide metabolism and mitochondria Ca transport following renal ischemia."* Am. J. Physiol. 250 : F357-F363, 1986.
- AZOULAY, D., LEMOINE, A., DENNISON, A., GRIES, J.M., DOLIZY, I., BARBAZZA, F., BONHOMME, L., BEAUNE, P. and BISMUTH, H. *"Relationship between cytochrome P-450 3A content of orthotopically transplanted liver and postoperative morbidity."* Transplant. Proc. 25 : 2630-2631, 1993.
- BAQUET, A., HUE, L., MEIJER, A.J., VAN WOERKORN, G.M. and PLOMP, P.J.A.M. *"Swelling of rat hepatocytes stimulates glycogen synthesis."* J. Biol. Chem. 265 : 955-959, 1990.
- BARAKAT, M. and DU SOUICH, P. *"Effect of Nifedipine on the elimination of theophylline in the rabbit subjected to hypoxia or to nan inflammatory reaction."* J. Pharm. Pharmacol. 48 : 906-910, 1996.
- BARBIER, P.A., LUDER, P.J., WAGNER, H.E., BARBIER, A. and MATTLER, D. *"Orthotopic liver transplantation in pigs without cold perfusion of the donor liver."* Transplantation. 63 : 612-614, 1997.

- BARKER, C.W., FAGAN, J.B. and PASCO, D.S.** *"Interleukin-1 β suppresses the induction of P-450-1A1 and P-450-1A2 mRNAs in isolated hepatocytes."* J. Biol.Chem. 267 : 8050-8055, 1992.
- BELZER, F.O. and SOUTHARD, J.H.** *"Principles of solid organ preservation by cold storage."* Transplantation. 45 : 673-676, 1988.
- BENET, L.Z., MITCHELL, J.R. and SHEINER L.B.** *"Pharmacokinetics : the dynamics of drug absorption, distribution, and elimination.* In : The Pharmacological Basis of Therapeutics, (Goodman Gilman A., eds.), Pergamon Press. Toronto. 8th edition : 3-32, 1990.
- BERSON, A., WOLF, C.V., BERGER, V., CHACHATY, C., FAU, D., FROMEUTY, B. and PESSAYRE, D.** *"Generation of free radicals during the reductive metabolism of the nitroaromatic compound, nilutamide."* J. Pharmacol. Exp. Ther. 257 : 714-719, 1991.
- BESSE, T., GUSTIN, T., CLAEYS, N., SCHROEYERS, P. and LAMBOTTE, L.** *"Effect of PG12 and thromboxane antagonist on liver ischemic injury."* Eur. Surg. Res. 21 : 213-217, 1989.
- BODET, B.P. and KILBERG, M.S.** *"Amino acid-dependant increase in hepatic system N activity is linked to cell swelling."* J. Biol. Chem. 266 : 7376-7381, 1991.
- BOOKSTEIN, C., DEPAOLI, A.M., XIE, Y., NIU, P., MUNSCH, M.W., RAO, M.C. and CHANG, E.B.** *"Na⁺/H⁺ exchangers, NHE1 and NHE3, of rat intestine. Expression and localisation."* J. Clin. Invest. 93 : 106-113, 1994.
- BOYER, J.L., GRAF, J. and MEIER, P.J.** *"Hepatic transport systems regulating pH_i, cell volume, and bile secretion."* Annu. Rev. Physiol. 54 : 415-438, 1992.

- BRASS, C.A., CRAWFORD, J.M., NARCISO, J.P. and GOLLAN, J.L.** *"Evaluation of University of Wisconsin Cold-Storage — Solution in Warm Hypoxic Perfusion of Rat Liver : The Addition of Fructose Reduces Injury."* Gastroenterology. 105 : 1455-1463, 1993.
- BREZIS, M., ROSEN, S., Sliva, P. and Epstein, F.H.** *"Renal ischemia : a new perspective."* Kidney Int. 26 : 375-383, 1984.
- BROWN, A.C. and BRENGELMANN, G.** *"Energy metabolism."* In Physiology and Biophysics, ed. by RUCH T. PATTON H.D. Saunders, Philadelphia, chap. 53 : 295-312, 1965.
- BURGER, H.J., SCHUETZ, E.G., SCHUETZ, J.D. and GUEZLIAN, P.S.** *"Divergent effects of cycloheximide on the induction of class II and class III cytochrome P-450 nRNAs in cultures of adult rat hepatocytes."* Arch. Biochem. Biophys. 281 : 204-211, 1990.
- CALMUS, Y., CYNOBER, L., DOUSSET, B., LIM, S.K., SOUBRANE, O., CONTI, F., HOUSSIN, D. and GIBOUDEAU, J.** *"Evidence for the detrimental role of proteolysis during liver preservation in humans."* Gastroenterology. 108 : 1510-1516, 1995.
- CALWELL-KENKEL, J.C., CURRIN, R.T., TANAKA, Y., THURMAN, R.G. and LEMASTERS, J.J.** *"Küppfer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers : effects of reperfusion."* Hepatology. 13 : 83-95, 1991.
- CARLES, J., FAWAZ, R., NEAUD, V., HAMONDI, N.E., BERNARD, P.H., BALABAUD, C. and BIOULAC-SAGE. P.** *"Ultrastructure of human liver grafts preserved with U.W. solution. Comparison between patients with low and high postoperative transaminases levels."* J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 26 : 67-73, 1994.

- CHEUNG, J.Y., BONVENTRE, J.V., MALIS, C.D. and LEAF, A. "*Calcium and ischemic injury.*" N. Engl. J. Med. 314 : 1670-1676, 1986.
- CHIEN, K.R., ABRAMS, J., SERRONI, A., MARTIN, J.T. and FARBER, J.L. "*Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury.*" J. Biol. Chem. 253 : 4809-4817, 1978.
- CHWALBINSKA-MONETA, J. "*Role of hepatic portal osmoreception in the control of ADH release.*" Am. J. Physiol. 236 : E603-E609, 1979.
- CLAVIEN, P.A., HARVEY, P.R.C. and STRASBER, S.M. "*Preservation and reperfusion injuries in liver allografts.*" Transplantation. 53 : 957-978, 1992.
- COLLINS, G.M. and WICOMB, W.N. "*New organ preservation solutions.*" Kidney. 42 : S197-S202, 1992.
- COLLINS, G.M., BRAVO-SHUGARMAN, M.B. and TERASAKI, P.I. "*Kidney perfusion and 30 hour ice storage.*" Lancet. 2 : 1219-1224, 1969.
- COLLINS, G.M., WICOMB, W.N., WARREN, R. WONG, L., BRYW, I., FEDUSK, N.J. and SALVATIERRA, O. "*Canine and cadaver Kidney preservation with sodium lactobionate sucrose solution.*" Transplant. Proc. 25 : 1588-1590, 1993.
- CORSANTI, J.G., GLEASON, D. and BOYER, J.L. "*Effects of osmotic stress on isolated rat hepatocytes I. Ionic mechanisms of cell volume regulation.*" Am. J. Physiol. 258 : G357-G363, 1990.
- DE GROOT, H. and BRECHT, M. "*Reoxygenation injury in rat hepatocytes : Mediation by 02-eH2O2 liberated by sources other than xanthine oxidase.*" Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 372 : 35-41, 1991.

- DEMETRIOU, A. "*Bioartificial livers.*" The annual Meeting of American Association for the study of liver diseases, Chicago. 2 November. (abstract). 1991
- DEMETRIOU, A., REISNER, A., SANCHEZ, J., LEVENSON, S.M., MOSCIONI, A.D. and CHOWDHURY, J.R. "*Transplantation of micro-carrier-attached hepatocytes into 90% partially hepatectomized rats*". *Hepatology*. 8 : 1006-1009, 1988.
- DENISON, M.S. and WHITLOCK, J.R. "*Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes.*" *J. Biol. Chem.* 270 : 18175-18178, 1995.
- EDMONDSON, J.W. and LUMENG, L. "*Biphasic stimulation of amino acid uptake by glucagon in hepatocytes.*" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96 : 61-68, 1980.
- FAU, D., BERSON, A., EUGENE, D., FROMENTY, B., FISCH, C. and PESSAYRE, D. "*Mechanism for the hepatotoxicity of the antiandrogen nilutamide. Evidence suggesting that redox cycling of this nitroaromatic drug leads to oxidative stress in isolated hepatocytes.*" *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263 : 69-77, 1992.
- FERGUSON, D.M., GORES, G.J., LUDWIG, J. and KROM, R.A. "*U.W. solution protects against reperfusion injury inhibiting lipid peroxidation.*" *Transplant. Proc.* 23 : 1552-1553, 1991.
- FORESTAL, D.A., HAIMOVICI, J. and HADDAD, P. "*Different effect of cold storage and rewarming on the urea pH regulating transporters in isolated rat hepatocytes.*" *Am. J. Physiol.* 272: G638-G645, 1997.
- FULLER, B.J., BUSZA, A.L., PROCTOR, E., MYLES, M., GADIAN, D.G. and HOBBS, K.E.F. "*Control of pH hypothermic liver storage: The role of storage solution.*" *Transplantation.* 45 : 239-241, 1988.

- GASBARRINI, A., BORLE, A.B., FARGHALI, H.J., FRANCAVILLA, A. and VAN THIEL, D.**
"Fructose Protects Rat Hepatocytes from anoxic Injury. — Effect on Intracellular ATP, Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺ and pH_i." J. Biol. Chem. 26 : 7545-7552, 1992.
- GAUSSIN, V., BAQUET, A. and HUE, L.** *"Cell shrinkage follows, rather than mediates, the short-term effects of glucagon on carbohydrate metabolism."* J. Biochem. 287 : 17-20, 1992.
- GEBHARDT, R. and KLEEMANN, E.** *"Hormonal regulation of amino acid transport system N in primary cultures of a rat hepatocytes."* Eur. J. Biochem. 166 : 339-344, 1987.
- GOLDFARB, D., IAINA, A., SERBAN, I., GAVENDO, S., KAPULER, S. and ELIAHOU, H.**
"Beneficial effect of verapamil in ischemic acute renal failure in the rat." Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 172 : 389-392, 1983.
- GOODRICH, E.O., WELCH, H.F. and NELSON, J.A.** *"Homo-transplantation of the canine liver."* Surgery. 39 : 244-251, 1956.
- GRAF, J., HADDAD, P., HAEUSSINGER, D. and LANG, F.** *"Cell volume regulation in liver."* Renal. Physiol. Biochem. 3-5 : 202-220, 1988.
- GROENEWOUD, A.F., ISEMER, F.E., STADLER, J., HEIDECHE, C.D., FLORACK, G. and HOELSCHER, M.** *"A comparison of early function between kidney grafts protected with IFCK solution versus Euro-Collins solution."* Transplant. Proc. 21 : 1243-1244, 1989.

- GUENGERICH, F.P. and TURVY, C.G.** *"Comparison of levels of several microsomal cytochrome P-450 enzymes and epoxide hydrolase in normal and disease states using immunochemical analysis of surgical liver samples."* J. Pharmacol. Exp. Therap. 256 : 1189-1191, 1991.
- GUENGERICH, F.P. and LIBLER, D.C.** *"Enzymatic activation of chemicals to toxic metabolites."* CRC Crit. Rev. Toxicol. 14 : 259-307, 1985.
- HADDAD, P., BECK, J.S., BOYER, J.L. and GRAF, J.** *"Role of chloride ions in liver cell volume regulation."* Am. J. Physiol. 261 : G340-G348, 1991.
- HADDAD, P. and GRAF, J.** *"Volume-regulatory K fluxes in the isolated perfused rat liver : characterisation by ion transport inhibitors."* Am. J. Physiol. 257 : G357-G363, 1989.
- HADDAD, P., NOËL, J., VADNAIS, J., MATHÉ, L. and VALLERAND, D.** *"Cold preservation and rewarming modulate the expression of membrane transport proteins involved in liver cell pH and volume regulation."* Hepatology. 26 : 353A. (abstract). 1997.
- HAEUSSINGER, D. and LANG, F.** *"Cell volume in the regulation of hepatic function : a mechanism for metabolic control."* Biochim. Biophys. Acta. 1071 : 331-350, 1991.
- HAEUSSINGER, D., HALLBRUCKER, C., VOM DAHL, S., DECKER, S., SCHWEIZER, U., LANG, F. and GEROK, W.** *"Cell volume is a major determinant of proteolysis control in liver."* FEBS Lett. 283 : 70-72, 1991.

- HAEUSSINGER, D., STEHLE, T. and LANG, F. "*Volume regulation in liver : Further characterisation by inhibitors and ionic substitution.*" *Hepatology*. 11 : 243-254, 1990.
- HALLBRUCKER, C., VOM DAHL, S., LANG, F., GEROK, W. and HAEUSSINGER, D. "*Inhibition of hepatic proteolysis by insulin. Role of hormone-induced alterations of the cellular K⁺ balance.*" *Eur. J. Biochem.* 199 : 467-474, 1991.
- HAMAMOTO, I., NEMOTO, E.M., EVANS, R.W., MISCHINGER, H.J., FUJITA, S., MURASE, N. and TODO, S. "*Rat liver lipids during ex vivo warm and cold ischemia and reperfusion.*" *J. Surg. Res.* 65 : 382-389, 1993.
- HAMAMOTO, I., TANAKA, S., MARBA, T., CIKAIALXI, K. and ICHIKAWA, Y. "*Microsomal cytochrome P-450 linked monooxygenase systems and lipid composition of human hepatocellular carcinoma.*" *Br. J. Cancer.* 59 : 6-11, 1989.
- HANSSON, R., JONSON O. LUNDSTAMS, S., PETERSSON, S., SCHERSTEN, T. and WALDENSTROM, J. "*Effect of free radical scavengers on renal circulation after ischemia in the rabbit.*" *Clin. Sci.* 65 : 605-610, 1983.
- HARRISON, D.C., LEMASTERS, J.J. and HERMAN, B. "*A pH dependent phospholipase A₂ contributes to loss of plasma membrane integrity during chemical hypoxia in rat hepatocytes.*" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174 : 654-659, 1991.
- HOLPERT, J., NASLUND, B. and BETNER, I. "*Suicide inactivation of rat liver cytochrome P-450 by chloramphenicol in vivo and in vitro.*" *Mol. Pharmacol.* 23 : 445-52, 1983.

- HONKAKOSKI, P. and NEGISHI, M. *"Characterisation of phenobarbital responsive enhancer module in mouse P450 Cyp2b10 gene."* J. Biol. Chem. 271 : 9746-9753, 1997.
- HONKAKOSKI, P. and NEGISHI, M. *"Regulatory DNA element of phenobarbital responsive cytochrome P450 CYP2B genes."* J. Biochem. Toxicol. 12 : 3-9, 1998.
- HONKAKOSKI, P., MOORE, R., WASHBURN, K. and NEGISHI, M. *"Activation by diverse xenochemicals of the 51-bp phenobarbital responsive enhancer module in mouse P450 Cyp2b10 gene."* Mol. Pharmacol. 53 : 597-601, 1998 (a).
- HONKAKOSKI, P., ZELKO, I., SUEYOSHI, T. and NEGISHI, M. *"The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital responsive enhancer module in mouse P450 CYP2B gene."* Mol. Cell. Biol. 18 : 5652-5658, 1998 (b).
- HOUSER, W.H., HINES, R.N. and BRESNICK, E. *"Implication of the 4S polycyclic aromatic hydrocarbon binding protein in the transregulation of rat cytochrome P-450c expression."* Biochemistry. 24 : 7839-7845, 1985.
- IMAMURA, H., SUTTO, F. and DE GROOT, H. *"Role of Kupffer cells in cold ischemia-reperfusion injury of rat liver."* J. Gastroenterology. 109 : 189-197, 1995.
- IZUISHI, K., ICHIKAWA, Y., HOSSAIN, M.A., MAEBA, T., MAETA, H. and TANAKA, S. *"Effects of cold preservation and reperfusion on microsomal cytochrome P-450 linked monooxygenase system of the rat liver."* J. Surg. Res. 61 : 361-366, 1996.
- JAESCHKE, H. *"Preservation injury : mechanisms, prevention and consequences."* J. Hepatology. 25 : 774-780, 1996.

- JAESCHKE, H., FARHOOD, A. and SMITH, C.W.** *"Neutrophils contribute to ischemia / reperfusion injury in rat liver in vivo."* FASEB J. 4 : 3355-3357, 1990.
- JAMIESON, N.V.** *"A new solution for liver preservation."* Br. J. Surg. 76 : 107-108, 1989.
- JAMIESON, N.V., JOHNSTON, P.S., O'GRADY, J.C., SMITH, M.F., FRIEND, P.G., ROLLES, K. and CALNE, R.Y.** *"Clinical use of U.W. Solution or a simplified liver preservation solution prior to transplantation in 179 human livers."* Transplant. Proc. 22 : 2189-2189, 1990.
- KALANT, H.** *"Drug biotransformation."* Principles of medical pharmacology. 5th ed. 35-48, ed. by KALANT, H., Oxford University Presse, New York. 1989.
- KHAN, D., ESQUIVEL, C.O., MAKOWKA, L., MASDRIGAL-TORRES, M., YUNIS, E., IWATSUKI, S. and STARZL, T.E.** *"Causes of death after transplantation in children treated with cyclosporine and steroids."* Clin. Transplantation. 3 : 150-155, 1989.
- KILBERG, M.S., KRISTENSEN, H.N. and HANDLOGTEN, M.E.** *"Cysteine as a system specific substrate for transport system ASC in rat hepatocytes."* Biochem. Biophys. Res. Commun. 88 : 744-751, 1979.
- KILBERG, M.S., HANDLOGTEN, M.E. and KRISTENSEN, H.N.** *"Characteristics of amino acid transport system in rat liver for glutamine, asparagine, histidine, and closely related analogs."* J. Biol. Chem. 255 : 4011-4019, 1980.
- KIM, S-K., BELZER, F.O. and SOUTHARD, J.H.** *"Loss of mitochondrial respiratory function and its suppression during cold ischemic preservation of rat livers with University of Wisconsin solution."* Hepatology. 16 : 742-748, 1992.

- KNICKLE, L.C., SPENCER, D.F. and RENTON, K.W. *"The suppression of hepatic cytochrome P-450a mRNA mediated by the interferon inducer polyinosinic polycytosidylic acid."* Biochem. Pharmacol. 44 : 604-608, 1992.
- KRISTENSEN, H.N. *"Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism."* Physiol. Rev. 70 : 43-77, 1990.
- KRISTENSEN, L.O. *"Associations between transports of alanine and cations across cell membrane in rat hepatocytes."* Am. J. Physiol. 251 : G575-G584, 1986.
- KUSNE, S., DUMMER, J.S., SINGH, N., IWATSUKIS, S., MAKOWKA, L., ESQUIVEL, C., TZAKIS, A.G., STARZL, T.E. and HO, M. *"Infection after liver transplantation : an analysis of 101 consecutive cases."* Medicine. 67 : 132-143, 1988.
- KVIETYS, P.R., INAUEN, W. BACON, B.R. and GRISHAM, M.B. *"Xanthine oxidase-induced injury to endothelium : role of intracellular iron and hydroxyl radical."* Am. J. Physiol. 257 : 1640-1648, 1992.
- LANG, F., STEHLE, T. and HAEUSSINGER, D. *"Water, K⁺, H⁺, lactate and glucose fluxes during cell volume regulation in perfused rat liver."* Pflugers Arch. 413 : 209-216, 1989.
- LARSON, O., AMMALA, P.R., BOKVIST, K., FREDHOLM, B. and RORSMAN, P. *"Stimulation of the kATP channel by ADP and diazoxide requires nucleotide hydrolysis in mouse pancreatic - β -cells."* J. Physiol. 463 : 349-365, 1993.
- LEFEBVRE, V., GOFFIN, I. and BUC-CALDERON, P. *"Fructose Metabolism and Cell survival in freshly Isolated Rat Hepatocytes Incubated under Hypoxic Conditions : Proposals for Potential Clinical Use."* Hepatology. 20 : 1567-1576, 1994.

- LODGE, J.P., PERRY, S.L. and Potts, D.J. *"Improve porcine renal preservation with simple extracellular solution-PBS140."* Transplantation. 51 : 514-519, 1991.
- LU, A. and COON, M.J. *"Role of Hemoprotein P-450 in Fatty acid ω -hydroxylation in a soluble enzyme system from the liver microcosms. ."* J. Biol. Chem. 243 : 13311-13332, 1968.
- MA, Q., DANNAN, G.A., GUENGERICH, F.P. and YANG, C.S. *"Similarities and differences in the regulation of hepatic cytochrome P-450 enzymes by diabetes and fasting in male rats."* Biochem. Pharmacol. 38 : 3179-3184, 1989.
- MARSH, D.C., BELZER, F.O. and SOUTHARD, J.H. *" Hypothermic preservation of hepatocytes. II. Importance of Ca²⁺ and amino acids."* Cryobiology. 27 : 1-8, 1990.
- MARSH, D.C., LINDELL, S.L., FOX, L.E., BELZER, F.O. and SOUTHARD, J.H. *"Hypothermic preservation of hepatocytes. The role of cell swelling."* Cryobiology. 26 : 524-534, 1989.
- MASSON, J. and BECK, F. *"Intracellular electrolyte composition following renal ischemia."* Kidney. Int. 20 : 61-70, 1981.
- MC INTYRE, T.M., ZIMMERMAN, G.A. and PRESCOTT, S.M. *"Leukotricines C and D, stimulate human endothelial cells to synthesise platelet activating factor and bind neutrophils."* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 51 : 2204-2208, 1986.
- MEIJER, A.J., BAQUET, A., GUSTAFSON, L., VAN WOERKORN, G.M. and HUE, L. *"Mechanism of activation of liver glycogen synthesis by swelling."* J. Biol. Chem. 267 : 5823-5829, 1992.

- MOSELEY, R.H.** *"Hepatic uptake of amino acids."* In : *Hepatic Transport and Bile Secretion : Physiology and Pathophysiology*, edited by TAVOLONI, N. and BERK, P.D. Raven Press, New York. pp 337-349, 1993.
- MURRAY, M. and REIDY, G.F.** *"Selectivity in the inhibition of mammalian cytochromes P-450 by chemical agents."* *Pharmacol. Rev.* 42 : 85-101, 1990.
- NAGEL, R.A., DIRIX, L.Y., HAYLLAR, K.M., PREISIG, R., TREDGER, J.M. and WILLIAMS, R.** *"Use of quantitative liver function tests – caffeine clearance and galactose elimination capacity – after orthotopic liver transplantation."* *J. Hepatology.* 10 : 149-157, 1989.
- NEBERT, D.W., ANDESICK, M., COON, M.J., ESTRABROOK, R.W., GONZALES, F.J., GUENGERICH, F.P., GUNSALUS, I.C., JOHNSON, E.F., KMPER, B. and LEVIN, W.** *"The P-450 gene superfamily : recommended nomenclature."* *DNA.* 6 : 1-11, 1987.
- NEUBERGER, J.** *"Liver allograft rejection- current concept in diagnosis and treatment."* *J. Hepatology.* 23 : 54-51, 1995.
- NOËL, J. and POUYSSÉGUR, J.** *"Hormonal regulation, pharmacology, and membrane sorting of vertebrate Na⁺/H⁺ exchanger isoforms."* *Am. J. Physiol.* 268 : C283-C296, 1995.
- NORRED, W.P. and WADE A.E.** *"Dietary fatty acid-induced alterations of hepatic microsomal drug metabolism."* *Biochem. Pharmacol.* 21 : 2887-2897, 1972.
- NOSHIRO, M. and OMURA, T.** *"Immunochemical study on the electron pathway from NADPH to cytochrome P-450 of liver microsomes."* *J. Biochem.* 83 : 61-77, 1978.

- NUNES, FA., KUMAR, C., CHANCE, B. and BRASS, CA. *"Chemiluminescence measurement of increased free radical formation after ischemia-reperfusion."* Dig. Dis. Sci. 40 : 1045-1053, 1995.
- OAKLAND, C.D.H., HICKMAN, R. and TERBLANCHE, J. *"The aminopyrine breath test predicts the outcome of hepatic transplantation in pigs."* Hepatology. 9 : 602-605, 1989.
- OESCH, F. *"Mammalian epoxide hydrolases : inducible enzymes catalysing the inactivation of carcinogenic and cytochrome metabolites derived from aromatic and olefinic compounds."* Xenobiotica. 68 : 392-410, 1972.
- OESCH-BARTOLOMOWICZ, B. and OESCH, F. *"Phosphorylation of cytochrome P-450 isoenzymes in intact hepatocytes and its importance for their function in metabolic processes."* Arch. Tropical. 64 : 257-261, 1990.
- OGAWA, S., GERLACH, H., ESPOSITO, C., PASAGIAN-MACAULAY, A., BRET, J. and STERN, D. *"Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium."* J. Clin. Invest. 85 : 1090-1098, 1990.
- OKUDA, M., LEE, H.C., KUMAR, C. and CHANCE, B. *"Oxygen radical generation during ischemia-reperfusion in the isolated perfused rat liver monitored by enhanced chemiluminescence."* Circ. Shock. 38 : 228-237, 1992.
- OLINGA, P., MEREMA, M., SLOOFF, M.J.H., MEIJER, D.K.F. and GROOTHUIS, G.M.M. *"Influence of 48 hours of cold storage in University of Wisconsin organ preservation solution on metabolic capacity of rat hepatocytes."* J. Hepatol. 27 : 738-743, 1997.

- ORTIZ, D.E., MONTELLANO, P.R., BAILAN, H.S., KUNZE, K.L. and MICO, B.A. *"Destruction of cytochrome P-450 by ethylene. Structure of the resulting prosthetic heme adduct."* J. Biol. Chem. 256 : 4395-4399, 1981.
- PARK, Y., LI, H. and KEMPER, B. *"Phenobarbital induction mediated by a distal CYP2B2 sequence in rat liver transiently transfected in situ."* J. Biol. Chem. 271 : 23725-23728, 1996.
- PESSAYRE, D. *"Physiopathologie des hépatites médicamenteuses."* Gastroenterol. Clin. Biol. 17 : H3-H17, 1993.
- PESSAYRE, D., LARRREY, D., MC INTYRE, N., BENHAMOU, J.P., BIRCHER, J., RIZETTO, M. and RODEZ, J. *"Drug-induced liver injury."* In Oxford Textbook of Clinical Hepatology. ed. by MC INTYRE, N., Oxford University Presse, New York. . pp 875-902, 1992.
- PESSIN, J.E. and BELL, G.I. *"Mammalian facilitative glucose transporter family : Structure and molecular regulation."* Annu. Rev. Physiol. 54 : 911-930, 1992.
- PLOEG, R.J., D'ALESSANDRO, A.M., KNETCHTLE, S. J., STEGALL, M. D., PIRSCH, J. D., HOFFMAN, R.M., SASAKI, T., SOLLINGER, H.W., BELZER, F.O. and KAYALOGLY, M. *"Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation- a multivariate analysis."* Transplantation. 55 : 807-813, 1993.
- POLAND, A., GLOVER, E. and KENDE, A.S. *"Stereo specific high affinity binding of 2, 3, 7, 8, -tetrachlorodibenzo -p- dioxin by hepatic cytochromeosol. Evidence that the binding species is a receptor for induction of arylhydrocarbon hydroxylase."* J. Biol. Chem. 251 : 4936-4946, 1976.

- PORTER, T.D. and COON, M.J. "*Cytochrome P-450 – Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms.*" J. Biol Chem. 266 : 13469-13472, 1992.
- PYERIN, W. and TANIGUCHI, H. "*Phosphorylation of hepatic phenobarbital-inducible cytochrome P-450.*" EMBO J. 8 : 3003-3010, 1989.
- PYERIN, W., TANIGUCHI, H., HORN, F., Oesch, F., Amelizad, Z., Fridberg, T. and Wolf, C.R. "*Isoenzyme specific phosphorylation of cytochrome P-450 and other drug metabolising enzymes.*" Biochem. Biophys. Res. Commun. 142 : 865-892, 1987.
- RAO, P.N., LIU, T., SYNDER, J.T., PLATT, J.L. and STARZL, T.E. "*Reperfusion injury following cold ischemia activates rat liver Küppfer cells.*" Transplant. Proc. 23 : 666-669, 1991.
- RODICIO, J.L., MORALES, J.M. and RUILOPE, L.M. "*Calcium antagonists and the kidney.*" Nephrol. Dial. Transplant. 5 : 81-86, 1990.
- ROSSER, B.G. and GORES, G.J. "*Liver cell necrosis : mechanism and clinical implications.*" Gastroenterology. 185 : 252-275, 1995.
- SANDKER, G.W., SLOOFF, M.J.H. and GROOTHULS, G.M.M. "*Drug transport, viability and morphology of isolated rat hepatocytes preserved for 24 hours in University of Wisconsin solution.*" Biochem. Pharmacol. 43 : 1479-1485, 1992.
- SERRAR, H. and HADDAD, P. "*Effects of cold preservation and rewarming on rat liver cell volume regulation and concentrative amino acid uptake.*" Gastroenterology. 112 : 1344-1353, 1997.

- SERRAR, H. and HADDAD, P. "*Effets de l'anoxie et du rechauffement sur le transport d'acides aminés par mesure du volume hépatocellulaire chez le rat.*" Cahier du XIII ième Atelier du Groupe de recherche en transport membranaire. (abstract). 1995.
- SERRAR, H. LANDRÉ, J.F. and HADDAD, P. "*Effects of cold preservation and rewarming on isolated rat hepatocyte amino acid transport systems A, ASC, and N.*" Gastroenterol. 108 : A1167. (abstract). 1995.
- SERRAR, H., HZARIF, M., VALLERAND, D. and HADDAD, P. "*Effects des hormones pancréatiques sur le volume hépatocellulaire.*" Programme Scientifique du 65 ième Congrès international de l'Association des Médecins de Langue Francaise du Canada, p.79. (abstract). 1993.
- SHAPIRO, J.I., CHEUNG, J.Y., ITABASHI, A., CHAN, L. and SCHRIER. R.W. "*The effect of verapamil in renal function after warm and cold ischemia in isolated perfused rat kidney.*" Transplant. Proc. 23 : 666-669, 1985.
- SOUTHARD, J.H. and BELZER, F.O. "*Organ preservation.*" Annu. Rev. Med. 46 : 235-247, 1995.
- SOUTHARD, J.H. and BELZER, F.O. "*Organ preservation.*" In *Principles of organ transplantation*. Ed. by FLY, M.W. Saunders, Philadelphia. pp 194-215, 1989.
- SOUTHARD, J.H. and BELZER, F.O. "*The University of Wisconsin Organ Preservation Solution : Components, Comparisons, and Modifications.*" Transplant. Rev. 7 : 176-190, 1993.

- SOUTHARD, J.H., RICE, M.J. and BELZER, F.O. *"Preservation of renal function by adenosine stimulated synthesis in hypothermically perfused dog kidneys."* Cryobiology. 22 : 237-245, 1985.
- SOUTHARD, J.H., VAN GULIK, T.M., AMETANI, M.S., VREUGDENHIL, P.K., LINDELL, S.L., PIENAAR, B.L. and BLEZER, F.O. *"Important components of the U.W. solution."* Transplantation. 49 : 251-257, 1990.
- SRIVASTAVA, G., BHATNAGAR, R., VISWANATHAN, R. and VENKITASUBRA, T.A. *"Microsomal and mitochondrial cytochrome in acutely hypoxic rat lung and liver."* Indian J. Biochem. Biophys. 17 : 130-134, 1980.
- STARZL, T.E., TODO, S., TZAKIS, A.G., GORDON, R.D., MAKOWKA, L., STIEBER, A., PODESTA, L. and YANAGA, K. *"Liver transplantation : an unfinished product."* Transplant. Proc. 21 : 2197-2200, 1989.
- STANLEY, L.A., ADAMS, D.J., BALKWILL, F.R., GRIFFIN, D. AND WOLF, C.R. *"Differential effects of recombinant interferon α on constitutive and inducible cytochrome P-450 isoenzymes in mouse liver."* Biochem. Pharmacol. 42 : 311-320, 1991.
- STRASBERG, S. M., HOWARD, T. K., MOLMENTI, E. P. and HERT, M. *"Selecting the donor liver: Risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation."* Hepatology. 20 : 829-838, 1994.
- STROBEL, H.W., LU, A.Y., HEIDEMA, J. and COON, M.J. *"Phosphatidylcholine requirement in the enzymatic reduction of hemo-protein P-450 and in fatty acid, hydrocarbon, and drug hydroxylation."* J. Biol. Chem. 245 : 4851-4854, 1970.

- STROTHER, A., THROCKMORTON, J.K. and HERZER, C. *"The influence of high sugar consumption by mice on the duration of action of barbiturates and in vitro metabolism of barbiturates, analine and p-nitroanisole.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 179 : 490-498, 1971.
- SUMIMOTO, R., DOHL, K., URUSHIHARA, T., JAMIESON, N.V., ITO, H., SUMIMOTO, K. and FUKADA, Y. *"An examination of the effects of solutions containing histidine and lactobionate for heart, pancreas, and liver preservation in the rat."* Transplantation. 53 : 1206-1210, 1992.
- SUMIMOTO, R., JAMIESON, N.V., WAKE, K. and KAMADA, N. *"24 hour rat liver preservation using U.W. solution and some simplified variants."* Transplantation. 48 : 1-5, 1989.
- SUMIMOTO, R. JAMIESON, N.V. FUKUDA, Y., DOHI, K. and KAMADA, N. *"The need for glutathione and allopurinol in HL solution for rat liver preservation."* Transplantation. 52 : 565-567, 1991.
- SUMIMOTO, R., KAMADA, N., JAMIESON, N.V., FUKUDA, Y. and DOHI, K. *"A comparison of a new solution combining histidine and lactobionate with U.W. Solution and Euro-Collins for rat liver preservation."* Transplantation. 51 : 589-695, 1992.
- TAKEL, Y., MARXI, I., KAUFFMAN, F.C., CURRIN, R.T., LEMASTERS, J.J. and THURMAN, B.G. *"Increase in survival time of liver transplants by protease inhibitors and a calcium channel blocker, N isoldipine."* Transplantation. 50 : 14-20, 1990.

- TAMARAPPO, B.K., HANDLOGTEN, M.E., LAINE, R.D., SERRANO, M.A., DUGAN, J. and KILBERG, M.S. *"Identification of protein responsible for hepatic system N amino acid transport activity."* J. Biol. Chem. 267 : 2370-2374, 1992.
- TERASAKI, P.E. *"History of transplantation. Thirty-five recollections."* UCLA Tissue Typing Laboratory, Los Angeles, 1991.
- TESTA, B. and JENNER, P. *"Inhibitions of cytochrome P-450s and their mechanisms of action."* Drug. Metab. Rev. 12 : 1-117, 1981.
- TIERNEY, B., MUNZER, S. and BRESNICK, E. *"The isolation and characterisation of specific 3-methylcholanthene-binding proteins from rat liver cytochromeosol."* Arch. Biochem. Biophys. 225 : 826-835, 1983.
- TROTTIER, E., BELZIL, A., STOLTZ, C. and ANDERSON, A. *"Localisation of a phenobarbital-responsive element (PBRE) in the 5'-flanking region of the rat CYP2B2 gene."* Gene. 158 : 263-268, 1995.
- TOKUNAGA, Y., WICOMB, W.N., CONCEPCION, W., NEKAZATO, P., COLLINS, G.M. and ESQUIVEL, C.O. *"Successful 20-hour rat liver preservation with chlorprimazine in sodium lactobionate sucrose solution."* Surgery. 110 : 80-86, 1991.
- VAN ROSSUM, G.D.V. and RUSSO, M.A. *"Requirement of Cl and Na⁺ for the ouabain-resistant control of cell volume in slices of rat liver."* J. Memb. Biol. 77 : 63-75, 1984.
- VAN THIEL, D.H., DINDZANS, V.J., GAVALER, J.S. and TARTER, R.E. *"The postoperative problems and management of the liver transplant."* In Progress in Liver Disease. Ed by POPPER, H. SCHAFFNER, F. WB Saunders, Philadelphia. pp 657-685, 1990.

- VREUGDENHIL, P.K., MARSH, D.C., BELZER, F.O. and SOUTHARD, J.H. *"Urea and protein synthesis in cold-preserved isolated rat hepatocytes."* Hepatology. 16 : 241-246, 1992.
- WADE, A.E. *"Effects of dietary fat on drug metabolism."* J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 6 : 161-189, 1986.
- WEINBERG, J.M. *"Oxygen deprivation induced injury to isolated rabbit kidney tubules."* J. Clin. Invest. 76 : 1193-1208, 1986.
- WEINBERG, J.M., DAVIS, J.A., ABARUZA, M. and KIANI, T. *"Relationship between cell adenosine triphosphate and glutathione content and protection by glycine against hypoxic proximal tubule cell injury."* J. Lab. Clin. Med. 113 : 612-622, 1989.
- WEINBERG, J.M., DAVIS, J.A., ABARUZA, M. and RAJAN, T. *"Cytochromeoprotective effects of glycine and glutathione against hypoxic injury to renal tubules."* J. Clin. Invest. 80 : 1446-1454, 1987.
- WEINBERG J.M., VARANI, J., JOHNSON, K.J., ROESER, N.F., DAME, M.K., DAVIS, J.A. and VENKATACHALAM, M.A. *"Protection of human umbilical vein endothelial cells by glycine and structurally similar amino acids against calcium and hydrogen peroxide-induced lethal cell injury."* Am. J. Pathol. 140 : 457-471, 1992.
- WETZELS, J.F.M., WANG, X., GENGARO, P.E., NEMENOFF, R.A., BURKE, T.J. and SCHEURESIER, R.W. *"Glycine protection against hypoxic but not phospholipase A₂-induced injury in rat proximal tubules."* Am. J. Physiol. 264 : F94-F99, 1993.

- WIELAN, D.E., SCHÜTZ, E., ARMSTRONG, V.W., KÜTTER, F., HELLER, C. and OELLERICH, M. *"Idebenone protects hepatic microsomes against oxygen radical-mediated damage in organ preservation solutions."* Transplantation. 60 : 444-451, 1995.
- WILLIAMS, J.F., BEMENT, W.J., SINCLAIR, J.F. and SINCLAIR, P.R. *"Effect of interleukin 6 on phenobarbital induction of cytochrome P-450IIB in cultured rat hepatocytes."* Biochem. Biophys. Res. Commun. 17B : 1049-1055, 1991.
- WRIGHT, K. and MORGAN, E.T. *"Regulation of cytochrome P-450IIC12 expression by interleukin-1a, interleukin-6 and dexamethasone."* Mol. Pharmacol. 39 : 468-474, 1991.
- YANG, C.S., BRADY, J.F. and HONG, J.Y. *"Dietary effects on cytochrome P-450, xenobiotic metabolism, and toxicity."* FASEB J. 6 : 737-744, 1992.
- YOO, J.S.H., HONG J.Y., NING , S.M. and YANG, C.S. *"Roles of dietary corn oil in the regulation of cytochrome P-450, xenobiotic metabolism, and toxicity."* FASEB J. 6 : 737-744, 1992.
- YOUNES, M. and STRUBELT, O. *"Cyanide-induced injury to the isolated perfused rat liver."* Toxicol. 63 : 382-385, 1988.
- YOUNES, M., MOHEURES, A., SCHOENBERG, M.H. and SCHILDBERG, F.W. *"Inhibition of lipid peroxidation by superoxide dismutase following regional intestinal ischemia and reperfusion."* Res. Exp. Med. 187 : 9-17, 1987.
- YU, W., CODDINGTON, D. and BRITTER-SUERMAN H. *"Rat liver preservation. I. the components of U.W. solution that are essential to its success."* Transplantation. 49 : 1060, 1989.

- ZEID, I.M., BRONK, S.F., FESMIER, P.J. and GORES, G.J.** *"Cytoprotection by Fructose and Other Ketohexoses During Bile Salt — Induced Apoptosis of Hepatocytes."* Hepatology. 25 : 81-86, 1997.
- ZHANG, Z.Y. and KAMINSKY, L.S.** *"Characterisation of human cytochrome P-450 involved in theophylline 8-hydroxylation."* Biochem. Pharmacol. 39 : 205-211, 1995.
- ZWEIER, J.L., KUPPUSAMY, P. and LUTTY, G.A.** *"Measurement of endothelial cell free radical generation : evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues."* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 : 4046-4050, 1988.
- ZYSSET, T.** *"Aminopyrine pharmacokinetics in the rat may depend on hepatic blood flow."* Drug Metab. Dispos. 14 : 625-626, 1986.

