

CZESŁAW KASZUBKIEWICZ, JERZY KOTZ, JANUSZ A. MADEJ,  
ZBIGNIEW MICHALSKI, MARIAN TRUSZCZYŃSKI

## Wpływ witaminy E na aktywność enzymów i zachowanie się związków energetycznych w mięśniu sercowym w przebiegu wstrząsu endotoksycznego u świń

Zakład Anatomii Patologicznej Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych  
Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. C. Norwida 31, 50-375 Wrocław  
Zakład Mikrobiologii Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Zarówno w doświadczalnym wstrząsie endotoksycznym, jak i w przebiegu naturalnego zakażenia świń hemolitycznymi szczepami *E. coli* obserwuje się wyraźne uszkodzenie mięśnia sercowego (19—22). Wyrazem uszkodzenia są zaburzenia w aktywności enzymów biorących udział w fosforylacji tlenowej i glikolizie bez-tlenowej oraz rozsiąta fuksynochłonność mioblastów, uważana za wczesny objaw martwicy włókienek mięśniowych (22).

Celem niniejszej pracy było prześledzenie wpływu witaminy E (alfa-tokoferolu) — jako biologicznego antyutleniacza chroniącego lipidy błon biologicznych przed uszkodzeniem — na aktywność enzymów i zachowanie się związków energetycznych w mięśniu sercowym w przebiegu doświadczalnego wstrząsu endotoksycznego u świń.

### Material i metody

Badania przeprowadzono na 9 świńkach, 13 tygodniowych, rasy wielkiej białej polskiej. Zwierzęta podzielono na 3 grupy po 3 świnię w każdej. Grupa I stanowiła kontrolę. Świniom grupy II podawano domięśniowo przez okres 6 dni 5 ml płynu fizjologicznego. Zwierzętom grupy III wprowadzono w ten sam sposób 5 ml witaminy E (produkcji Polfa). Następnie świniom obu grup doświadczalnych II i III podano jednorazowo liofilizowaną endotoksynę (dipolisacharyd) uzyskaną metodą Westphala i wsp. (33) z hemolitycznych szczepów *E. coli*, należących do serotypu O141. Endotoksynę rozpuszczono w 5 ml płynu fizjologicznego i wprowadzono do żyły usznej w dawce 2 mg/kg masy ciała. Zwierzętom kontrolnym podano dożylnie sam płyn fizjologiczny w tych samych dawkach.

U zwierząt doświadczalnych grupy II i III śledzono objawy kliniczne, następnie ubijano je po upływie 24 godzin od chwili podania endotoksyny; podobnie postępowano ze zwierzętami grupy kontrolnej I. Po zabiciu zwierząt wykonano sekcję pobierając wycinki z obu komór serca i przedsionków do badań histopatologicznych, histoenzymatycznych i histochemicznych.

Z odpowiednio utrwalonego materiału wykonano skrawki parafinowe barwiąc je hematoksyliną i eozyną wodną oraz metodą Selye'go w modyfikacji Poley'a (30) — na fuksynochłonność włókien mięśniowych. Glikogen wykrywano metodą McManus-Hotchkissa (1). Lipidy obojętne metodą Lillie Auhurna (1, 9). Badania histoenzymatyczne przeprowadzono na skrawkach kriostatowych grubości 10 mikronów. Fosfatazę zasadową — FZ (E.C.3.1.3.1) — ujawniano metodą precypitacyjną Gomoriego, adenozyntroójfosfatazę — ATP-azę (E.C.3.6.1.3) — metodą Wachstein-Meisela, dehydrogenazy — bursztynianową — SDH (E.C.1.3.99.1) oraz mleczanową — LDH (E.C.1.1.1.27) — zmodyfikowaną metodą Nachlas i wsp. (1, 9). Wymienione reak-

cje histoenzymatyczne wykonywano inkubując skrawki przez 30 minut w temperaturze 310 K.

### Wyniki i omówienie

Objawy kliniczne. Objawy wstrząsu wystąpiły u wszystkich zwierząt bezpośrednio lub w kilka minut po podaniu endotoksyny. Przebiegały one pod postacią niewydolności krążenia (sinica skóry, przyspieszenie oddechów), chwiejnego chodu oraz wiosłowych ruchów kończyn w pozycji leżącej. Silne ślinienie poprzedzało zawsze wymioty i wzmożone oddawanie kału. Te dwa ostatnie objawy, szczególnie wymioty trwały około 1 godz. Objawy wstrząsu ustępowały, ale do chwili zabicia (do 24 godz.) stwierdzało się u świń całkowity brak apetytu. Objawy kliniczne wstrząsu, choć przebiegały podobnie w obu grupach doświadczalnych, wyraźniej jednak były nasilone w grupie II. Zmiany sekcyjne były identyczne jak w badaniach wcześniejszych (22).

Badania histopatologiczne. U zwierząt obu grup doświadczalnych obserwowano poburzenie komórek śródłonka naczyń oraz mierny obrzęk tkanki łącznej śródmięśniowej, podnasierdziowej i podwiersdziowej. Miejscami zespoły włókien mięśniowych wykazywały zaawansowane zwyrodnienie mięszkowe oraz ziarnisty rozpad cytoplazmy. Obserwowano ponadto obrzęk jąder mioblastów i wyraźną eozynochłonność poszczególnych włókien mięśniowych. Opisane zmiany o charakterze wstęcznym były mniej zaawansowane w grupie III. W zakresie mięśnia sercowego świń kontrolnych zmian nie stwierdzono.

Fuksynochłonność mięśnia sercowego. W grupie zwierząt kontrolnych nie stwierdzono zjawiska fuksynochłonności włókien mięśniowych. Stwierdzono ją natomiast u wszystkich zwierząt obu grup doświadczalnych. Fuksynochłonność miała charakter rozsiąty i obejmowała bądź poszczególne mioblasty, bądź całe ich zespoły. Stopień nasilenia i rozległość zmian była wyraźniej zaznaczona w grupie II w porównaniu z III.

Badania histoenzymatyczne. Wyniki badań histoenzymatycznych i histochemicznych przedstawiono schematycznie na ryc. 1.

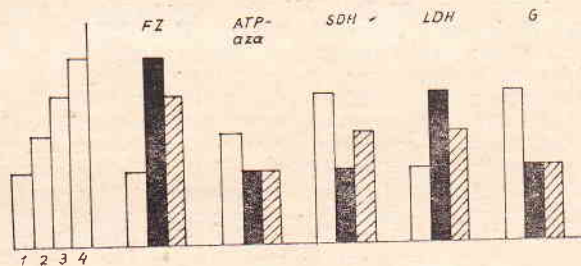
Fosfataza zasadowa (FZ). W mięśniu sercowym świń kontrolnych miernie nasilony odczyn na FZ obejmował sieć włóscinek oraz śródłonek większych naczyń krwionośnych. W porównaniu z kontrolą, w grupie II aktywność enzymu wyraźnie wzrastała, ponadto odczyn obejmował o wiele większą ilość włóscinek i średnich naczyń krwionośnych. Miejscami, szczególnie w komorze lewej spotykano nieliczne zespoły mioblastów reagujących dodatnio na FZ. W grupie III lokalizacja reakcji była podobna jak w grupie II, natomiast intensywność odczynu słabsza.

Adenozyntroójfosfataza (ATP-aza). W grupie zwierząt kontrolnych wyraźny odczyn na ATP-azę loka-

lizował się w sieci włócneczek, błonie plazmatycznej komórek śródnabłonka większych naczyń krwionośnych i wsierdzia. W grupie II, w zakresie naczyń serca obserwowano znaczny spadek odczynu, był on zwykle słaby lub nikły i tylko w nielicznych włócneczkach prawidłowy. W grupie III ilość naczyń krwionośnych wykazujących zanik reakcji na ATP-azę była mniejsza aniżeli w grupie II.

Dehydrogenaza bursztynianowa (SDH). U zwierząt kontrolnych wyraźny odczyn lokalizował się w mioblastach, słabo zaznaczał się w śródbłonku i mięśniówce naczyń krwionośnych. Opisana reakcja występowała pod postacią drobnych ziarnistości formazanu koloru intensywnie niebieskiego, rzadko fioletowego. W grupie II odczyn był wyraźnie zróżnicowany, miejscami intensywny — gruboziarnisty, miejscami ulegał zanikowi. U zwierząt grupy III spadek reakcji na SDH był słabiej zaznaczony, również rzadziej spotykano włókna mięśniowe charakteryzujące się gruboziarnistym odczynem.

Dehydrogenaza mleczanowa (LDH). W grupie kontrolnej słaby, drobnoziarnisty odczyn na LDH lokalizował się w cytoplazmie mioblastów oraz ścianach naczyń krwionośnych. W grupie II liczne zespoły włókien mięśniowych cechowały się wyraźnym wzrostem reakcji na SDH, która miejscami była wyraźnie gruboziarnista. W grupie III obserwowano podobne zmiany z tą jednak różnicą, że ilość włókien mięśniowych wykazujących intensywną, miejscami gruboziarnistą reakcję była mniejsza.



Objasnienia: □ - grupa kontrolna I  
■ - grupa doświadczalna II  
▨ - grupa doświadczalna III

FZ - fosfataza zasadowa, ATP-aza - adenozynotrafosfataza, SDH - dehydrogenaza bursztynianowa, LDH - dehydrogenaza mleczanowa, G - glikogen, 1 - odczyn mierny, 2 - odczyn umiarkowany, 3 - odczyn silnie dodatni, 4 - odczyn bardzo silnie dodatni.

Ryc. 1. Odczyny histoenzymatyczne i histochemiczne w mięśniu sercowym świń

Badania histochemiczne. Glikogen w mięśniu sercowym zwierząt kontrolnych występował pod postacią licznych, rozproszonych ziarnistości zlokalizowanych w mioblastach. Zarówno w grupie II, jak i III stwierdzono wyraźny zanik glikogenu. Ilość ziarnistości w zespołach włókien mięśniowych znacznie malała, a w innych obok leżących obszarach glikogen zniknął zupełnie.

Lipidy obojętne — zarówno w grupie kontrolnej, jak i doświadczalnej III nie stwierdzono zmian o charakterze nacieczenia lub zwyrodnienia tłuszczowego włókien mięśniowych. W grupie II miejscami w mioblastach pojawiały się nieliczne kropelki trójglicerydów.

Rola witaminy E w metabolizmie ustroju nie jest dokładnie poznana. Wiadomo jednak, że jej niedobór zwiększa zużycie tlenu przez komórki mięśnia sercowego powoduje gromadzenie nadtlenków lipidów i innych produktów autooksydacji, zmniejsza poziom związków wysokoenergetycznych i prowadzi do zmian zwyrodnieniowo-martwiczych mioblastów (15,

25, 27, 28, 32). Ponadto alfa tokoferol jest komponentem reduktazy NADH cytochromu c i wpływa pośrednio na transport elektronów w fosforylacji tlenowej (16, 29). Witamina ta jest uważana przez wielu autorów za biologiczny antyutleniacz, zapobiegający między innymi utlenianiu nienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład lipidów błon organelli komórkowych (2, 10, 11, 13, 23, 34, 36). Inni autorzy uważają że nie spełnia ona tej roli (4, 12, 14, 17, 18).

Przy niedoborze tej witaminy powstaje w organizmie nadmiar wolnych rodników (3, 8, 35), natomiast podawanie alfa tokoferolu zwierzętom powoduje wyraźne obniżenie ich poziomu (24). Wolne rodniki będąc aktywnymi utleniaczami mogą uszkadzać błony organelli komórkowych. Przemawiają za tym badania, które wykazały, że witamina E w sposób wyraźny stabilizuje błony lizosomów (31). Jej niedobór wywołuje natomiast uszkodzenie tych organelli, w następstwie czego dochodzi do uwolnienia szeregu hydrolaz. Zjawisko to występuje w przebiegu dietetycznej dystrofii mięśni (5), w wysiękowej szkiecie krwotocznej (5), w macicy pod koniec ciąży (6) oraz w zaniku jąder (7). Ponadto Ostrowski (26) wykazał obniżenie poziomu alfa tokoferolu w surowicy krwi chorych na zawał serca oraz mięśniu sercowym i surowicy krwi szczurów w przebiegu doświadczalnej mikromartwicy serca.

Dotychczasowe, jak i obecnie przeprowadzone badania własne wykazały, że zarówno w przebiegu naturalnego zakażenia świń hemolitycznymi szczepami *E. coli* (21), jak i doświadczalnym wstrząsie endotoksycznym (19, 20, 22) dochodzi do wyraźnego uszkodzenia mięśnia sercowego. Wyrazem tego uszkodzenia, poza fuksynochłonnością włóknienek mięśniowych, są zaburzenia w aktywności enzymów biorących udział w fosforylacji tlenowej (SDH) i glikolizie beztlenowej (LDH). Zmianom tym towarzyszy równocześnie szybkie wyczerpanie zasobów energetycznych — ATP i glikogenu oraz zaburzenia przemiany kwasów tłuszczowych. Punktem wyjścia opisanych zmian jest uszkodzenie mitochondriów mioblastów. Pociąga ona za sobą wyłączenie fosforylacji tlenowej, co z kolei uniemożliwia spalanie kwasów tłuszczowych stanowiących główne źródło przemian energetycznych. W wyniku tych zaburzeń dochodzi do znacznego upośledzenia syntezy ATP, a w następstwie odblokowania glikozy beztlenowej i do szybkiego wyczerpania glikogenu.

W wyniku badań własnych stwierdzono, że w przebiegu wstrząsu endotoksycznego, w zależności od stopnia uszkodzenia mitochondriów występuje znaczne nasilenie odczynów histoenzymatycznych na ATP-azę i SDH. W mioblastach o mniejszym uszkodzeniu mitochondriów stwierdzono wzrost reakcji na SDH oraz pojawienie się, w wyniku obrzęku i zwiększonej

przepuszczalności błon mitochondrialnych, intensywnego odczynu na ATP-azę. Odczynu te występowały w postaci grudek lub nieforemnych tworów. W komórkach mięśniowych o znacznym uszkodzeniu mitochondriów spotykano często spadek lub całkowity zanik reakcji na SDH. Wiadomo, że wskutek uszkodzenia mitochondriów następuje upośledzenie wytwarzania wysokoenergetycznego związku, jakim jest ATP.

Obserwowany spadek aktywności SDH i wyraźny wzrost odczynu na LDH świadczą, że w mechanizmie syntezy ATP wciągnięte zostają procesy glikozy beztlenowej, której celem jest wyrównanie przynajmniej w pewnym stopniu deficytu ATP. Objawia się to wyraźnym spadkiem zawartości glikogenu w mioblastach i wzrostem aktywności na LDH. Dochodzi równocześnie do zaburzeń przemiany kwasów tłuszczowych, będących głównym źródłem energii z następowym nagromadzeniem się ich we włóknach mięśnia sercowego (22). Tego rodzaju zmiany wystąpiły u zwierząt w przebiegu samego wstrząsu (grupa II). Natomiast u świń otrzymujących witaminę E (grupa III) zarówno objawy kliniczne wstrząsu, jak i zmiany histoenzymatyczne i histochemiczne były słabiej zaznaczone. Stopień zaburzeń w aktywności badanych enzymów był mniejszy. Nasilenie fuksynochłonności włókien mięśniowych było słabiej zaznaczone. Nie stwierdzono również zmian o charakterze nacieczenia tłuszczowego mioblastów obserwowanego u zwierząt nie otrzymujących witaminy E.

Przeprowadzone badania zdają się przemawiać za ochronnym wpływem alfa tokoferolu na mięsień sercowy w przebiegu wstrząsu endotoksycznego u świń.

#### Piśmiennictwo

1. Barka T., Anderson P. J.: *Histochemistry theory, practice and bibliography*, Harper-Row, Publ. Inc. N. Y. Evanston, London, 1969.
2. Bieri J. G., Anderson A. A.: *Arch. Bioch. Bioph.* 90, 105, 1960.
3. Budowski P., Mokadi S.: *Biochim. Biophys. Acta* 52, 609, 1961.
4. Bunyan J., Diplock A. T., Green J.: *Br. J. Nutr.* 21, 217, 1967.
5. Bunyan J., Green J., Diplock A. T.: *Br. J. Nutr.* 21, 127, 1967.
6. Bunyan J., Green J., Diplock A. T.: *Br. J. Nutr.* 21, 137, 1967.
7. Bunyan J., Green J., Diplock A. T.: *Br. J. Nutr.* 21, 205, 1967.
8. Carpenter M. P., Kitabski A. E., McCay P. B., Caputto R.: *J. biol. Chem.* 234, 2814, 1959.
9. Chayen J., Bitensky L., Buther R.: *Practical histochemistry*. J. Wiley Sons, London, 1973.
10. Csallamy A. S., Draper H. H.: *Arch. Bioch. Bioph.* 92, 462, 1961.
11. Dam H.: *Experientia* 1, 195, 1953.
12. Diplock A. T., Bunyan J., McHale D., Green J.: *Br. J. Nutr.* 21, 103, 1967.
13. Diplock A. T., Green J., Bunyan J., McHale D., Muthy J. R.: *Br. J. Nutr.* 21, 115, 1967.
14. Diplock A. T., Green J., Bunyan J., Cowthorne M. A., Dawson J.: *Br. J. Nutr.* 21, 725, 1967.
15. Goettsch M., Pappenheimer A. M.: *J. exp. Med.* 54, 145, 1931.
16. Gray D. E., Chisholm J., Lee Pneg C. H.: *J. Vitamin* 5, 291, 1960.
17. Green J., Diplock A. T., Bunyan J., McHale D., Muthy J. R.: *Br. J. Nutr.* 21, 69, 1967.
18. Green J., Diplock A. T., Bunyan J., Muthy J. R., McHale D.: *Br. J. Nutr.* 21, 497, 1967.
19. Kaszubkiewicz C., Ugorski L., Zalesński A.: *Medycyna Wet.* 22, 724, 1966.
20. Kaszubkiewicz C., Kotz J.: *Medycyna Wet.* 27, 406, 1971.

21. Kaszubkiewicz C., Kotz J., Truszczyński M.: *Pol. Arch. wet.* 17, 199, 1974.
22. Kaszubkiewicz C., Truszczyński M., Kotz J., Michalski Z., Houszka M.: *Medycyna Wet.* 36, 593, 1980.
23. Machlin L. J., Gordon R. S., Meishy H. H.: *J. Nutr.* 67, 333, 1959.
24. Madej J. A.: *Praca przygotowana do druku.*
25. Olson R. E.: *Circulation Res.* 48, 179, 1973.
26. Ostrowski J.: *Pol. Tyg. lek.* 34, 45, 1980.
27. Pappenheimer A. M.: *Am. J. Path.* 15, 179, 1939.
28. Pappenheimer A. M.: *Am. J. Path.* 18, 169, 1942.
29. Pitt G. A. J., Morton R. A.: *A. Rev. Bioch.* 31, 491, 1962.
30. Foley R. W., Fobes C. D., Hall M. J.: *Arch. Path.* 77, 325, 1964.
31. Roels O. A.: In — *Lysosomes in biology and pathology*. Edited J. T. Dingle, Am. Els. Publ. CO, INC — N. Y. 1979.
32. Sylven C. H.: *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 47, 9, 1976.
33. Westphal O., Lüderik O., Bester E.: *Z. Naturf.* 76, 148, 1952.
34. Zalkin H., Tappel A. L.: *Arch. Bioch. Bioph.* 88, 113, 1960.
35. Zalkin H., Tappel A. L.: *Arch. Bioch. Bioph.* 80, 113, 1962.
36. Zalkin H., Tappel A. L., Caldwell K. A., Shibko S., Desai I. D., Halliday T. A.: *J. biol. Chem.* 237, 2678, 1962.

Adres autora: doc. dr habil. Zbigniew Michalski, ul. Bałuckiego 3/3, 50-034 Wrocław.

Кашубкевич Ч., Котц Я., Мадей Я. А., Михальский З., Трущинский М. — Влияние витамина Е на активность энзимов и поведение энергетических соединений в сердечной мышце в ходе эндотоксического шока у свиней.

Исследования провели на 9 свиньях, 13-недельных, разделенных на 3 группы. Группа I составляла контроль. Свиньям группы II ввели в течение 6 дней внутримышечно физиологическую жидкость, животным же группы III чем же способом витамин Е. Затем у свиней группы II и III вызвали шок, вводя им однократно лиофилизированный эндотоксин в количестве 2 мг/кг м.т., полученный из гемолитических штаммов *E. coli* серотипа O141. Выполнили секционные, гистопатологические, гистохимические (гликоген, липиды), а также гистоэнзиматические (FZ, ATP-аза, SDH и LDH) исследования. У свиней группы II обнаружили отчетливые симптомы шока с повреждением сердечной мышцы. У свиней же, получающих витамин Е, как клинические симптомы шока так и гистопатологические изменения были слабее выражены. Степень нарушений активности энзимов была меньше, а также фуксинопоглощаемость мышечных вололок была слабее выражена. Проведенные исследования свидетельствуют о защитном влиянии витамина Е на сердечную мышцу в ходе эндотоксического шока у свиней.

Kaszubkiewicz C., Kotz J., Madej J. A., Michalski Z., Truszczyński M. — The influence of vitamin E on enzyme activities and behaviour of energetic compounds in heart muscle in the course of endotoxic shock in pigs.

The examinations were performed on 9 pigs at the age of 13 weeks in three groups. The animals of the I-st group served as a control. The animals of the II-nd group were given for 6 days im of 0.85% NaCl, and those of the III-rd group were given im vitamin E. Then in the animals of the II-nd and the III-rd group was developed shock by a single im injection of lyophilized endotoxin of haemolytic strains of *Escherichia coli*, serotype O141 at a dose of 2.0 mg/kg of body weight. The animals were examined for gross and microscopic anatomopathological lesions, histochemically (glycogen and lipids) and histoenzymatically (FZ, ATP-ase, SDH and LDH). I pigs of the II-nd group were noted distinct symptoms of shock with injury of the heart muscle. On the other hand, in pigs which obtained injections of vitamin E both clinical symptoms and histopathological lesions of shock were less pronounced. Also the level of disturbances in the activity of the enzymes was weaker, and fuksinophylism of the muscle fibres was less pronounced. The obtained results point to a protective role of vitamin E on the heart muscle in the course of endotoxic shock in pigs.