

Zakład Histologii i Embriologii. Instytut Biologiczno-Morfologiczny. Wydział Lekarski.
Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: prof. dr med. dr h.c. Stanisław Grzycki

Irena KRÓLIKOWSKA-PRASAŁ
Władysława JABŁOŃSKA

**Odczyny histochemiczne dehydrogenaz
w mięśniu sercowym szczura białego po podaniu Andiaminy**

Гистохимические реакции дегидрогеназ в сердечной мышце белой крысы после
подачи андиамина

Histochemical Reactions of Dehydrogenases in the Myocardium of White Rat after
Andiamin Application

Heksobendina — dwuchlorowodorek N, N' — [bis 3' (3', 4', 5' — trójmetoksybenzoksy) propylo] etylenodwuamina, produkowana przez ZPF „Polfar” pod nazwą fabryczną Andiaminy, znalazła zastosowanie w chorobie niedokrwiennej serca (15). Badania przeprowadzone przez Hammerl i wsp. (5) oraz Krauppa i wsp. (10) wskazują na to, że heksobendina wywiera działanie na przemianę tłuszczową i węglowodanową ustroju. Wykazano również, że niektóre leki nasercowe powodują zmiany w lokalizacji i aktywności enzymów komórkowych (4, 11, 12, 14). W naszych doświadczeniach chcieliśmy prześledzić wpływ Andiaminy (heksobendiny) na aktywność dehydrogenaz w mięśniu sercowym szczurów białych. Badania histochemiczne dehydrogenaz mają duże znaczenie, ponieważ są one związane z szeregiem procesów metabolicznych komórki, katalizują różne typy reakcji oksydoredukcyjnych, biorą udział w cyklu Krebsa, w cyklu pentozowym i glikolitycznym oraz w procesach energetycznych komórki (9, 17).

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Do doświadczeń wzięto 20 szczurów białych (c.c. około 200 g), które karmiono dietą standardową. Zwierzęta podzielono na dwie grupy doświadczalne i jedną grupę

kontrolną. W grupach doświadczalnych podawano szczurom w iniekcji Andiaminę (Zjed. Przem. Farmaceut. „Polfa”) w dawce 40 mg/kg ciężaru ciała raz dziennie, w I grupie przez okres 7 dni, w drugiej przez 21 dni. Zwierzęta grupy kontrolnej otrzymywały w tym samym czasie sól fizjologiczną. Po upływie 24 godzin od ostatniej iniekcji szczury dekapitowano i pobierano wycinki z lewej komory serca. Nie utrwalone skrawki cięto w kriostacie Pearse i wykonywano na nich odczyny histochemiczne na aktywność dehydrogenaz bursztynianowej, mleczanowej, izocytrynianowej i glikozo-6-fosforanowej oraz na reduktazy tetrazolowe NADH i NADPH. Inkubację przeprowadzano w temp. 37° przez 45 min. w przypadku dehydrogenazy bursztynianowej i glikozo-6-fosforanowej; pozostałe enzymy inkubowano przez 30 min. Jako przenośnika elektronów użyto nitro BT. Reakcje kontrolne wykonywano w środowisku bezsubstratowym w tych samych warunkach.

WYNIKI BADAŃ

Przeprowadzone przez nas doświadczenia wskazują na to, że aktywność enzymów oksydoredukcyjnych ulega osłabieniu po podaniu zwierzętom Andiaminy. Świadczą o tym odczyny cytoenzymatyczne uzyskane na preparatach mięśnia sercowego szczurów doświadczalnych. Reakcja na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach mięśnia sercowego szczura kontrolnego była intensywna, widoczna w mitochondriach w postaci niebieskich ziaren dwuformazanu ułożonych w szereg wzdłuż miofibrilli (ryc. 1), natomiast w I i II grupie doświadczalnej obserwowano osłabienie odczynów. Często obok niebieskich ziaren dwuformazanu występowały czerwone ziarna monoformazanu (ryc. 2). Również odczyny na aktywność dehydrogenazy mleczanowej na preparatach zwierząt kontrolnych były bardziej intensywne niż w grupach szczurów doświadczalnych. U zwierząt kontrolnych w mięśniu sercowym widoczne były niebieskie ziarna dwuformazanu, rozmieszczone regularnie wzdłuż miofibrilli, oraz odczyny dyfuzyjne w cytoplazmie komórek (ryc. 3). Nieznaczne osłabienie reakcji obserwowano w I grupie doświadczalnej, w której podawano zwierzętom Andiaminę przez okres 7 dni, natomiast w II grupie, gdzie okres podawania wynosił 21 dni, spadek aktywności enzymu był większy (ryc. 4). Wysoką aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej wykazano w mięśniu sercowym zwierząt kontrolnych (ryc. 5). Natomiast w obu grupach doświadczalnych zauważono znacznie słabsze odczyny na aktywność tego enzymu (ryc. 6). Dehydrogenaza glikozo-6-fosforanowa dawała w mięśniu sercowym szczurów kontrolnych intensywną reakcję występującą w postaci niebieskich ziaren dwuformazanu, a także widoczne były odczyny w postaci dyfuzyjnej w cytoplazmie komórek mięśniowych. Po podaniu zwierzętom Andiaminy zauważono osłabienie reakcji na dehydrogenazę glikozo-6-fosforanową już w I grupie doświadczalnej, tj. po 7 dniach podawania leku, a jeszcze większe różnice w porównaniu z odczynami u zwierząt kontrolnych wystąpiły w II grupie, gdzie preparat podawano przez 21 dni (ryc. 7). Aktywność reduktazy tetrazolo-

wej NADH na preparatach mięśnia sercowego zwierząt kontrolnych nie różniła się od odczynu uzyskanego zarówno w I, jak i w II grupie doświadczalnej (ryc. 8). We wszystkich przypadkach produkt reakcji enzymatycznej widoczny był w postaci niebieskich ziaren dwuformazanu, ułożonych liniowo wzdłuż miofibrilli. Również nie obserwowano zmian w reakcji enzymatycznej na aktywność reduktazy tetrazolowej NADPH w mięśniu sercowym szczurów doświadczalnych i kontrolnych.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Praca serca odbywa się kosztem energii wyzwolonej podczas przemian metabolicznych zachodzących w komórkach mięśnia sercowego. Tkanka mięśnia sercowego charakteryzuje się wysoką aktywnością enzymów oddechowych, enzymów cyklu Krebsa. Wysoka aktywność tych enzymów związana jest z funkcją mięśnia sercowego, gdzie zachodzą wzmożone procesy oksydoredukcyjne oraz konieczność dostarczania znacznej ilości energii potrzebnej do pracy komórek mięśnia sercowego. Jak wykazały badania Coopera (2), istnieją różnice między aktywnością dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach mięśniowych przedsionków i komór serca. Największą aktywność enzymu znajdowano w lewej komorze serca, gdzie zachodzi bardziej wzmożona praca komórek niż w przedsionkach. Inni autorzy uważają, (13, 14, 15), że stosunek ilości mitochondriów do miofibrilli wskazuje na aktywny współdziałanie procesów kurczliwych komórek mięśniowych.

W obserwowanych przez nas preparatach z grupy zwierząt kontrolnych widoczna była wysoka aktywność badanych dehydrogenaz. Szczególnie intensywne reakcje wykazywały dehydrogenazy bursztynianowa i izocytrynianowa oraz reduktazy tetrazolowe NADH i NADPH. Potwierdzają to również badania Diculesco i wsp. (3) wskazując na to, że tkanka mięśnia sercowego wykazuje bardzo dużą aktywność dla enzymów cyklu Krebsa i diaforaz, natomiast słabiej zaznaczona jest u pozostałych dehydrogenaz. Również badania Ogata i Mori (16) oraz Buno i Germini (1) stwierdzają, że w mięśniu sercowym występuje bardzo intensywna reakcja na dehydrogenazę bursztynianową, z tym że najsilniejszą reakcję wykazują komórki mięśniowe komór serca.

W wyniku podawania zwierzętom Andiaminy następowało obniżenie aktywności dehydrogenaz. Najbardziej wyraźne zmiany w odczynach histochemicznych tych enzymów widoczne były u zwierząt otrzymujących lek przez dłuższy czas t.j. przez 21 dni. Obniżenie aktywności dehydrogenaz bursztynianowej i izocytrynianowej może świadczyć o zaburzeniach w cyklu Krebsa. Dehydrogenaza bursztynianowa jest markerem mitochondriów, których czynność polega na katalizowaniu procesów tlenowej fosforyzacji, warunkuje aktywność syntetyczną komórki oraz zdolność

do wykonywania innych czynności, jak transport aktywny, skurcz mięśni itp. Różnice w aktywnościach dehydrogenazy bursztynianowej obserwowane przez nas u zwierząt otrzymujących Andiaminę i zwierząt kontrolnych mogły być spowodowane zarówno obniżeniem liczby mitochondriów, jak również obniżeniem aktywności enzymu wewnątrz mitochondriów. Inne enzymy, jak dehydrogenaza mleczanowa i glikozo-6-fosforanowa, wykazywały mniejsze osłabienie reakcji histochemicznych u zwierząt po podaniu Andiaminy w porównaniu z kontrolnymi. Nie wykazano istotnych różnic w aktywności reduktaz tetrazolowych NADH i NADPH u zwierząt otrzymujących Andiaminę.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że:

1. Andiamina powoduje znaczne obniżenie intensywności reakcji na aktywność dehydrogenaz bursztynianowej i izocytrynianowej, a niewielkie osłabienie aktywności dehydrogenaz mleczanowej i glikozo-6-fosforanowej w komórkach mięśniowych serca szczurów.

2. Nie wykazano istotnych różnic w aktywności reduktaz tetrazolowych NADH i NADPH po podaniu Andiaminy.

3. Obniżenie aktywności dehydrogenaz bursztynianowej i izocytrynianowej może wskazywać na zmniejszenie liczby mitochondriów i osłabienie procesów oksydoredukcyjnych w komórce mięśniowej serca.

PIŚMIENNICTWO

1. Bruno W., Germino N. J.: *Acta anat.* **33**, 161—174, 1958.
 2. Copper W. G.: *Anat. Rec.* **123**, 103—119, 1955.
 3. Diculesco L, Onicesco D., Mischiu L.: *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 145—152, 1964.
 4. Grzycki S., Królikowska-Prasał I.: *Z. mikrosk.-anat. Forsch., Leipzig* **86**, 193—203, 1972.
 5. Hammerl H., Kränzle Ch., Nebois G., Pichler O., Studlar M.: *Wien. Klin. Wochen.* **84**, 930—933, 1970.
 6. Harman J. W., Feigelson M.: *Exptl. Cell Res.* **3**, 47—58, 1952.
 7. Harman J. W., Feigelson M.: *Exptl. Cell Res.* **3**, 58—64, 1952.
 8. Harman J. W., Feigelson M.: *Exptl. Cell Res.* **3**, 509—525, 1952.
 9. Kaniuga Z.: *Post. Biochem.* **10**, 7—41, 1964.
 10. Kraupp O., Wolner E., Adler-Kastner L., Chirikdjian J. J., Ploszczanski B., Tuisle E.: *Arzneim. Forsch.* **16**, 967—973, 1966.
 11. Królikowska-Prasał I.: *Folia Morphol. (Warszawa)* **30**, 465—474, 1971.
 12. Królikowska-Prasał I.: *Patol. pol.* **23**, 225—234, 1972.
 13. Kulig A., Grydlewski R., Kostka-Trąbka B.: *VI Zjazd PTAP Lublin*, 1973, s. 36.
 14. Lee K. S., Choi J.: *J. Pharm. exp. Ther.* **153**, 114—120, 1960.
 15. Montowska L., Poddany K., Romański B.: *Terapia i Leki*, **24**, 406—411, 1974.
 16. Ogata T., Mori M.: *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 171—182, 1964.
 17. Uyeda K., Racher E.: *J. Biol. Chem.* **240**, 4682—4688, 1965.
- Otrzymano 25 X 1975.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Reakcja na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w mięśniu sercowym szczura kontrolnego. Metoda Nachlas i wsp. Pow. ok. 300×.

Ryc. 2. Odczyn na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w mięśniu sercowym szczura otrzymującego Andiaminę przez 21 dni. Metoda Nachlas i wsp. Pow. ok. 300×.

Ryc. 3. Odczyn na aktywność dehydrogenazy mleczanowej w mięśniu sercowym szczura kontrolnego. Reakcja wg Pearse. Pow. ok. 300×.

Ryc. 4. Reakcja na aktywność dehydrogenazy mleczanowej w mięśniu sercowym szczura otrzymującego Andiaminę przez 21 dni. Reakcja wg Pearse. Pow. ok. 300×.

Ryc. 5. Reakcja na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej w mięśniu sercowym szczura kontrolnego. Reakcja wg Pearse. Pow. ok. 300×.

Ryc. 6. Reakcja na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej w mięśniu sercowym szczura otrzymującego Andiaminę przez 21 dni. Reakcja wg Pearse. Pow. ok. 300×.

Ryc. 7. Odczyn na aktywność dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej w mięśniu sercowym szczura otrzymującego Andiaminę przez 21 dni. Reakcja wg Pearse. Pow. ok. 300×.

Ryc. 8. Reakcja na aktywność reduktazy tetrazolowej NADH w mięśniu sercowym szczura otrzymującego Andiaminę przez 7 dni. Reakcja wg Pearse. Pow. ok. 300×.

РЕЗЮМЕ

Исследования проводились на белых крысах, получивших андиамин „Польфа” в дозе 40 мг/кг веса тела, подаваемого в I группе в течение 7 дней, а во II — в течение 21 дня.

Гистохимические реакции на активность дегидрогеназ и тетразоловых редуктаз NADH и NADPH проводились на срезах из левого желудочка сердца.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что андиамин значительно снижает энзиматическую активность сукциндегидрогеназы и изоцитратдегидрогеназы, в меньшей степени — активность лактата дегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатановой дегидрогеназы. Изменения в активности тетразоловой редуктазы NADH и NADPH не наблюдались.

SUMMARY

White rats were injected with Andiamin "Polfa" in a dose of 40 mg/kg body weight for periods of 7 days in group I and 21 days in group II. Histochemical reactions to the dehydrogenases and NADH and NADPH tetrasole reductases activity were carried out on pieces of the left ventricular myocardium. The results showed that the Andiamin causes a great decrease in the succinic dehydrogenase and iso-citric dehydrogenase activity and small changes in the lactic dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. Differences in NADH and NADPH tetrasole reductases activity were not shown.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. Reaction to succinic dehydrogenase activity in the myocardium of a control rat. Method of Nachlas et al. $\times 300$.

Fig. 2. Reaction to succinic dehydrogenase activity in a rat myocardium after the administration of Andiamin for 21 days. Method of Nachlas et al. $\times 300$.

Fig. 3. Reaction to lactic dehydrogenase activity in the myocardium of a control rat. Method of Pearse. $\times 300$.

Fig. 4. Reaction to lactic dehydrogenase activity in a rat myocardium after the administration of Andiamin for 21 days. Method of Pearse. $\times 300$.

Fig. 5. Reaction to iso-cytric dehydrogenase activity in myocardium of a control rat. Method of Pearse. $\times 300$.

Fig. 6. Reaction to iso-cytric dehydrogenase activity in rat myocardium after the administration of Andiamin for 21 days. Method of Pearse. $\times 300$.

Fig. 7. Reaction to glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in a rat myocardium after the administration of Andiamin for 21 days. Method of Pearse. $\times 300$.

Fig. 8. Reaction to NADH tetrasole reductase activity in the myocardium of a rat after the administration Andiamin for 7 days. Method of Pearse. $\times 300$.



