

Institutul de biologie (cond.: prof. Székely Károly) și Laboratorul de cercetări virologice
(cond.: prof. Vendég Vince) ale I.M.F. din Tg.-Mureș

ACTIVITATEA FOSFATAZEI ALCALINE ÎN MUȘCHII EXTREMITĂȚILOR LA ȘOARECII NOI NĂSCUȚI INFECTAȚI CU VIRUSUL COXSACKIE

Wiener Ferenc, Abrahám Sándor, Babonits Magda

Materialul faptic din cercetările care se ocupă cu activitatea fosfatazei alcaline din mușchii paralizați ai extremităților șoarecilor noi născuți inoculați cu virusul Cocksackie de tip „A” este contradictoriu. *Kausche, Landschütz și Sauthoff* (1) dovedesc histochimic creșterea activității fosfatazei alcaline în mușchii paralizați. *Godman, Bunting și Melnick* (2) pe baza experiențelor efectuate conclud că precipitatul negru

considerat drept un semn neîndoielnic al activității fosfatazei alcaline este cauzat de radicalii fosforici care se eliberează din mușchii care se distrug. Radicalii fosforici eliberați, cu metoda Gömöri pentru punerea în evidență a activității fosfatazei alcaline dau un precipitat negru care imită întru totul activitatea fosfatazei alcaline.

Albrecht (3), Albrecht și Sauthoff (4) demonstrează biochimic creșterea activității fosfatazei alcaline. În același timp cantitatea fosforului anorganic, atât în mușchii extremităților animalelor de control, cât și în cei bolnavi nu prezintă nici o deosebire. După acești autori, n-are nici o bază reală acea afirmație după care creșterea activității fosfatazei alcaline s-ar datora legăturilor fosforice labile care se eliberează cu ocazia distrugerii mușchiului.

Datorită materialului faptic contradictoriu am găsit utilă examinarea problemei, cu atât mai mult cu cât, în cursul experiențelor preliminare precipitatul negru care imita activitatea fosfatazei alcaline în unele cazuri nu a putut fi observat în mușchii paralizați ai animalelor, în alte cazuri a fost observat într-o măsură mai mare sau mai mică.

Această observație ne atrage atenția asupra lipsurilor tehnice care ar putea exista în metoda de lucru folosită. Totodată ne-a impus să luăm în considerare unii factorii pe care autorii susamintiți i-au neglijat într-o anumită măsură; ca vârsta animalelor de experiență, gradul diluării suspensiilor virale folosite. Aceste condiții de experiență s-au dovedit a fi foarte importante și luându-le în considerare, ele au determinat uniformitatea rezultatelor, obținute în cursul experiențelor.

Material și metode. Pentru efectuarea experiențelor am folosit tulpina de virus Coxsackie „A” obținută de la bolnavii considerați îmbolnăviți de poliomielită. Acest virus izolat din materiile fecale, respectiv lichidul cefalo-rachidian al bolnavilor, inoculat la șoarecii noi născuți, a produs paraliza extremităților după 3—6 zile de la infecție, respectiv moartea animalelor. Efectuând pasaje succesive la șoarecii nou născuți, virusul a produs paraliza extremităților animalelor după 2—3 zile, respectiv moartea lor.

Virusul proaspăt izolat a paralizat și apoi a cauzat moartea numai la animalele de 1—3 zile. Animalele mai în vârstă inoculate cu acest virus proaspăt izolat au supraviețuit infecției. Virusul adaptat prin mai multe pasaje succesive la șoarecii nou născuți a produs paraliza și moartea animalelor mai în vârstă.

În experiențele noastre am întrebuințat șoarecii noi născuți de la 1—3 zile respectiv 13—15 zile. Diluția suspensiei virale era de 1:20 și 1:100.000. După apariția paralizii mușchii extremităților posterioare au fost fixați în acetonă absolută la 0°. Prezența fosfatazei alcaline a fost pusă în evidență cu metoda Gömöri modificată de *Kabat și Furth (5)*. Pentru inhibarea activității enzimice am efectuat experiențe paralele de control și anume: a) secțiunile de control au fost incubate într-o soluție incubatoare din care lipsea glicerofosfatul de sodiu, b) secțiunile de control au fost introduse 10 minute în apa distilată la 80°C. Depourire de fosfați au fost puse în evidență cu ajutorul metodei descrise de *Kossa (6)*.

Rezultatele experiențelor.

1. Extremitățile posterioare ale șoarecilor noi născuți de 3 zile inoculați cu o suspensie virală de 1:20 au paralizat la 3 zile după inoculare. În mușchii paralizați, creșterea activității fosfatazei alcaline n-a putut fi observată. De asemenea nici radicalii fosforici liberi n-au fost puși în evidență. Aspectul microscopic al secțiunilor de control unde activitatea enzimică a fost inhibată nu s-a deosebit de cele bolnave incubate în mod normal.

2. Animale de aceeași vârstă inoculate cu o suspensie virală de 1:100.000 au

prezentat semne evidente de paralizie după 4—5 zile. Cu metoda folosită în secțiunile din mușchi s-a pus în evidență o cantitate mică de precipitat negru îndeosebi în fibrele musculare pe cale de distrugere. Acest precipitat negru de formă rotundă se localizează pe suprafața fibrelor musculare pe teritorii circumscrise și imită activitatea pozitivă a fosfatazei alcaline. În secțiunile de control unde activitatea enzimatică a fost inhibată precipitatul negru s-a localizat topografic în aceleași regiuni. Cu metoda Kossa acest precipitat negru s-a dovedit a fi radicali liberi de fosfați.

3. Extremitățile posterioare ale animalelor în vîrstă de 14 zile inoculate cu o suspensie virală de 1:20 au paralizat după 5—7 zile. Cantitatea considerabilă de precipitat negru localizată în mușchii animalelor imită activitatea fosfatazei alcaline. În secțiunile de control unde activitatea enzimatică a fost inhibată acest precipitat s-a localizat topochimic în același loc, din care cauză despre o adevărată activitate enzimatică nu se poate vorbi. Ca și în cazul precedent precipitatul negru este rezultatul prezenței radicalilor liberi de fosfați.

4. Extremitățile posterioare ale animalelor de 14 zile inoculate cu o suspensie virală de 1:100.000 au paralizat după 7 zile. În secțiunile din mușchi se observă aceleași fenomene ca și în cele descrise la punctul 2. și 3. Cantitatea precipitatului care imită activitatea fosfatazei alcaline este însă mai mare.

În secțiunile mușchilor animalelor de control de 1—3 respectiv 14 zile atît activitatea fosfatazei alcaline cît și prezența radicalilor fosforici n-a putut fi observată.

Rezultatele experiențelor au fost incluse în tabelul de mai jos:

Numărul animalelor	Vîrsta animalelor	Diluția suspensiei virale	Debutul paraliziei	Activitatea enzimatică	Radical liber de fosfați
10	3 zile	1:20	3 zile	—	—
9	3 "	1:100.000	4—5 "	—	+
10	13—15 "	1:20	5—7 "	—	++
9	14 "	1:100.000	după 7 zile	—	+++
5 (control)	3 "	—	—	—	—
5 "	3 "	—	—	—	—

Interpretarea rezultatelor.

Concluziile experiențelor noastre coincid cu cele ale lui *Godman* și colab. În mușchii paralizați ai șoarecilor noi născuți infectați cu virusul Cocksackie activitatea crescută a fosfatazei alcaline cu metoda Gômori n-a putut fi pusă în evidență. Creșterea activității fosfatazei alcaline, obținută cu ajutorul metodelor biochimice — cu toate că rezultatele obținute cu metoda histochimică sînt negative — nu poate fi exclusă.

După *Lison* (7) fosfatasa este prezentă în țesuturi sub forma lio și desmo. Histochimic în general numai forma desmo poate fi detectată, forma lio cu ocazia fixării țesutului este îndepărtată de către agentul fixator. Din punct de vedere biochimic se poate pune în evidență atît forma desmo cît și lio. S-ar putea, ca creșterea activității forme lio să stea la baza deosebirilor observate în rezultatele obținute prin metodele biochimice și histochimice.

Din experiențele noastre reiese că vîrsta animalului, gradul diluării suspensiei virale și durata bolii influențează în mod hotărîtor procesele chimice din țesuturile lezate. Radicalii fosforici se eliberează din mușchi datorită distrugerii acestora și precum reiese din tabel, din punct de vedere cantitativ, sînt în raport direct cu vîrsta animalului și durata bolii și indirect cu gradul diluării suspensiei virale.

La șoarecii noi născuți de 1—3 zile inoculați cu virus adaptat prin mai multe pasaje, paralizia mușchilor este extrem de rapidă și animalele pier înaintea ca destructia mușchilor să fi avut loc. Din această cauză cantitatea radicalilor fosforici eliberați este neînsemnată și histochemic nu poate fi detectată.

La animalele mai vîrstnice de 14 zile destructia mușchilor este cu mult mai accentuată. Cauza acestui fenomen cu toată probabilitatea rezultă din rezistența crescută a animalelor mai bătrîne. Paralizia animalelor poate fi cauzată de o cantitate mai mare de virus, virusul înmulțindu-se în mușchi și cauzînd distrugerea lor. Din numeroasele combinații chimice cu un conținut de fosfor al mușchilor (fosfocreatina ATP, ADF) radicalii fosforici care se eliberează pot fi puși în evidență histochemic.

Trebuie să menționăm că în mușchii paralizați ai șoarecilor inoculați cu virusul poliomielitei, adaptat la aceste animale, distrugerea fibrelor musculare n-are loc. Histochemic nu s-a putut pune în evidență nici creșterea activității enzimatice a fosfatazei alcaline, nici radicalii fosforici liberi. Această problemă necesită desigur cercetări mai detaliate și se prezintă adecvată în vederea diferențierii virusului poliomielitei de virusul Cocksackie pe cale histochemică la animalele de experiență.

Sosit la redacție: la 13 martie 1958.

Bibliografie

1. KAUSCHE G. A., LANDSCHÜTZ GH., SAUTHOFF R.: Z. Naturforsch. 6b, 445, 1951;
2. GODMAN G. C., BUNTING H., MELNICK J. L.: AMER. J. Pathol. 28, 583, 1952;
3. AIBRECHT W., SAUTHOFF R.: Z. Naturforsch. 9 b, 340, 1954;
4. ALBRECHT W.: Z. Naturforsch. 9 b, 583, 1954;
5. KABAT E. A., Furth J.: Amer. J. Pathol. 17, 303, 1941;
6. PEARSE E. A. G.: Histochemistry J. and A. Churchill L. T. D. London 1954;
7. LISON L.: Bull. Histol. Tech. Micr. 25, 23, 1948.

ДЕЙСТВИЕ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В МЫШЦАХ КОНЕЧНОСТЕЙ НОВОРОЖДЕННЫХ МЫШАТ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ КОКСАККИ

Ф. Винер, Ш. Абрахам, М. Бабонитш

Авторы провели гистохимическое исследование действия щелочной фосфатазы в парализованных мышцах конечностей новорожденных мышат, инфицированных вирусом Коксаки „А“. В парализованных мышцах конечностей при применении гистохимических методов не наблюдалось увеличение деятельности щелочной фосфатазы. На основе контрольных опытов и торможения энзиматической деятельности доказано, что черный осадок, характерный для деятельности щелочной фосфатазы, совершенно свободен от неорганических фосфатов. Количество фосфатных радикалов нарастает параллельно деструкции мышцы. Продолжительность болезни, возраст подопытного животного и степень разбавления вирусного раствора оказывают решающее влияние на появление фосфатных радикалов.

L'ACTIVITÉ DE LA PHOSPHATASE ALCALINE DANS LES MUSCLES DES EXTRÉMITÉS DES SOURIS NOUVEAU-NÉES, INFECTÉES PAR LE VIRUS COXSACKIE

Wiener F., Abraham S., Babonits M.

Les auteurs ont étudié, du point de vue histochemique, l'activité de la phosphatase alcaline dans les muscles paralysés des extrémités des souris nouveau-nées, infectées par le virus

Coxsackie „A“. Dans les muscles paralysés des extrémités, l'augmentation de la phosphatase alcaline n'a pas pu être observée à l'aide des méthodes histochimiques. Le précipité noir caractéristique à l'activité de la phosphatase alcaline, sur la base des expériences de contrôle et de l'inhibition des activités enzymatiques, a été trouvé dépourvu de phosphates anorganiques. La quantité de radicaux de phosphates augmente parallèlement avec la destruction du muscle. La durée de la maladie, l'âge des animaux d'expérience et le degré de la dilution de la suspension virale ont une influence décisive sur l'apparition des radicaux phosphatiques.
