The Pathology of Vegetative Endocarditis and Atherosclerosis Induced Experimentally in Rats

A
Thesis Submitted
By

Himen Hassan Othman Hassan

To
The Council of the College of Veterinary Medicine,
University of Mosul,
In Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master Science
In
Veterinary Pathology

Supervised By

Asst. Prof. Entisar R. O. AL-Kennany

1427 A.H. Thi Al-Hijja **2006 A.D. December**

SUMMARY

This study was revealed the capability of ***Enterococcus faecalis*** experimentally infected rats to induce vegetative endocarditis associated with initiation and development of atherosclerosis, dealing with the oxidative pathway role promoted by ***E faecalis***. In this study the oxidative pathway was estimated via a significant increase in the level of malondialdehyde (MDA) as indicator of lipid peroxidation, and significant decrease in glutathione (GSH) level in aorta, heart and liver which is considered as an enzymatic antioxidants, as well as initiation of atherosclerotic lesions in G_2 rats (infected with ***E. faecalis***) at 15, 30 and 45 days post infection (PI).Two hundred and ten(n=210)adult albino rat were used in this study and they are randomly divided in to seven groups (thirty rats each). Group $_1$ (G_1), considered as control ; G_2 : inoculated intraperitonealy (I/P) with 1ml ***E. faecalis*** suspension ($7.8x10^7$ CFU/ml) ; G_3 : treated with 0.5% H_2O_2 daily in drinking water ; G_4 : inoculated by ***E. faecalis*** and treated with 0.5% H_2O_2 ; G_5 : inoculated with ***E. faecalis*** and feed dietary vitamin E (600 mg/kg ration/day) ; G_6 : inoculated by ***E faecalis*** and treated with nitrofurantoin antimicrobial agents (5 mg/kg BW); and G_7 : inoculated with ***E faecalis*** and treated with both vitamin E and nitrofurantoin at the same doses above .

The results in this study were estimated through the following criteria at 15, 30 and 45 days post infection :

1. Isolation of ***E. faecalis*** directly from heart blood after sacrificing to study the cultural and morphological characteristics.
2. Measuring the phagocytic index value.

3.Measuring the lipid profile level in the serum represented by (cholesterol, triglycerides, high density lipoprotein cholesterol HDL-C, low density lipoprotein cholesterol LDL-C, very low density lipoprotein cholesterol VLDL-C and atherogenic index value.

4. Measuring the tissue level of MDA and GSH in heart, aorta and liver.

5. Studying the gross and histopathological changes of heart, aorta and liver by using different staining technique including sudan IV (Sudanophilia), hematoxylin and eosin (H&E), modified tissue gram stain (MTGS) and toluidine blue (1%) for plastic section staining.

The results of bacterial isolation from the heart blood reveal to the presence of oval or spherical purple color bacterial cells in Giemsa stained blood smear, and gram positive cocci in gram stained bacterial smear. On the other hand, ***E. faecalis*** grows readily on enriched, selective and differentiate media with cultural characteristic explained in chapter four. The Results of phagocytic index value were significantly increased at 15, 30 and 45 days PI in all infected and treated groups as compared with G_1, since it was more significant in G_4 and less significant in G_5, $_6$ and $_7$ at 45 days.

Furthermore the result in the present study revealed a significant increase in lipid profile with exception of HDL-C in $G_{2,3}$ and G_4 since its more significant in G_4 as compared with G_2 and G_1 . While in $G_{5,6}$ and $_7$ there was a significant decrease in lipid profile concomitant with significant increase in HDL-C at 30 and 45 days PI, since it's more significant in G_7 as compared with G_5 and $_6$ at 45 days PI.

Whereas, in MDA level (which is an indicator for oxidative stress and lipid peroxidation) in $G_{2,3}$ and $_4$ as compared with G_1 at 15, 30 and 45 of experiment period, since the elevated level was more significant in G_4 as compare with G_2. While the result in $G_{5,6}$ and $_7$ reveals a significant decrease of MDA level concomitant with significant increase in GSH level. However these values were more significant in G_5 and G_7 at 30 and 45 days.

This may be due to antioxidant properties of vitamin E by scavenging reactive oxygen species (ROS) and the synergistic effect of vitamin E and nitrofurantoin on bacterial growth and multiplication.

Furthermore, the result of histopathological examination revealed pathological changes in rats aorta of G_2 represented by severe proliferation and hypertrophy of vascular smooth muscle cells (VSMCs) toward the intima, associated with localization of lipid vacuoles and formation of foam cells in the intima and media as well as endothelial hypertrophy and fragmentation of elastic lamellae. These lesions were more severe and extensive in G_4 as compared with G_2 and G_3. Whereas they are less significant in G_5 and G_7 as compared with G_6 at 30 and 45 days PI.

On the other hand, histopathological changes in heart represented by vegetative endocarditis consist of platelets, fibrin, bacterial cells and leukocyte at 15 days PI, associated with necrosis , fatty change of myocardial muscle and infiltration of mononuclear inflammatory cells (MNCs) at period of 30 and 45 days PI., in G_2, while in G_4 there was extensive fatty change and necrosis associated with thrombi in the coronary artery.

Finally, results of histopathological changes in liver revealed the presence of focal area of necrosis associated with bacterial colonies and infiltration of MNCs in G_2 at 15 and 30 days PI, whereas, the lesions were more severe in G_4 concomitant with severe fatty change in the liver parenchyma at 30 and 45 days PI., while these lesions were markedly reduced in G_5, $_6$ and $_7$ at 30 and 45 days PI.

دراسة مرضية لالتهاب شغاف القلب الانمائي والتصلب العصيدي المحدثة تجريبيا في الجرذان

رسالة تقدم بها

هيمــن حســن عثمــان حســن

إلى

مجلس كلية الطب البيطري في جامعة الموصل

في اختصاص الطب البيطري / الأمراض البيطرية

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير

بإشراف

الأستاذ المساعد

الدكتورة انتصار رحيم عبيد الكنانـي

ذي الحجة ١٤٢٧هـ — كانون الأول ٢٠٠٦ م

الخلاصـــة

بينت هذه الدراسة قابلية جرثومة ***Enterococcus faecalis*** على إحداث التهاب شغاف القلب تجريبياً في الجرذان يصاحبها نشوء وتطور آفات التصلب العصيدي من خلال إحداث الإجهاد التأكسدي والتي تثبت دور ***E. faecalis*** في التحفيز على احداث الاجهاد التأكسدي . إذ تم ملاحظته من خلال الزيادة المعنوية في مستوى المالونداياالديهايد Malondialdehyde (MDA) الذي يعد مؤشراً لحدوث زناخة الدهون ، يقابلها انخفاض معنوي في مستوى الكلوتاثايون Glutathione (GSH) في أنسجة كل من الأبهر والقلب والكبد ، فضلاً عن نشوء آفات التصلب العصيدي في المجموعة الثانية (المخمجة بجرثومة ***E. faecalis***) عند الفترات ١٥ ، ٣٠ ، ٤٥ يوماً بعد الخمج .

تضمنت هذه الدراسة (٢١٠) من ذكور الجرذان البالغة قسمت عشوائياً إلى سبع مجاميع كل مجموعة ضمت (٣٠) جرذي . حقنت المجاميع عدا المجموعة الأولى والثالثة عن طريق التجويف الخلبي بمعلق جرثومي تركيزه (٧.٨×١٠^{٧} CFU/ml) ، حيث عدت المجموعة الأولى مجموعة سيطرة والثالثة عوملت ببيروكسيد الهيدروجين فقط بتركيز ٠.٥٪ والمجموعة الرابعة عوملت أيضا ببيروكسيد الهيدروجين بتركيز ٠.٥٪ ، أما المجموعة الخامسة فقد تم معاملتها بفيتامين E بعد الخمج بجرعة (٦٠٠ ملغم/كغم علف/يوم) والمجموعة السادسة تم معاملتها بالمضاد البكتيري Nitrofurantoin بجرعة (٥ ملغم/كغم من وزن الجسم) بعد ١٥ يوما من الخمج، والمجموعة السابعة فقد تم معاملتها بكل من فيتامين E و Nitrofurantoin بعد ١٥ يوما من الخمج.

أظهرت نتائج هذه الدراسة بعد مرور ١٥ ، ٣٠ ، ٤٥ يوماً عزل جرثومة ***E. faecalis*** من مجرى الدم في القلب إذ أظهر الفحص المجهري وجود خلايا جرثومية كروية أو بيضوية الشكل بنفسجية اللون بعد صبغها بصبغة كمزا ، وكانت موجبة لصبغة كرام فضلاً عن نموها على الأوساط الإنتخابية الخاصة بجرثومة ***E. faecalis*** . كما وأظهرت النتائج وجود زيادة معنوية في معدل معامل البلعمة عند الفترات ١٥ ، ٣٠ ، ٤٥ يوماً بعد الخمج عند كافة المجاميع المخمجة والمعاملة مقارنة بمجموعة السيطرة وكانت أكثر وضوحاً عند المجموعة الثانية .

كذلك بينت نتائج هذه الدراسة وجود زيادة معنوية في مستويات صورة الدهن والمتمثلة بالكولسترول والكليسريدات الثلاثية والشحوم البروتينية ذات الكثافة العالية والشحوم البروتينية ذات الكثافة الواطئة وذات الكثافة الواطئة جدا ودليل التعصد (Cholesterol, Triglycerides, High Density Lipoprotein-Cholesterol, Low Density Lipoprotein-Cholesterol, Very Low Density Lipoprotein-Cholesterol and Atherogenic Index) ما عدا HDL-C في المجموعة الثانية والثالثة والرابعة مقارنة مع المجموعة الأولى وكانت أشد أرتفاعاً في المجموعة الرابعة مقارنة مع المجموعة الثانية والثالثة ،

بينما لوحظ عند المجموعة الخامسة والسادسة والسابعة وجود انخفاض معنوي في مستوى صورة الدهن يرافقه ارتفاع معنوي في مستوى HDL-C عند الفترات ٣٠ ، ٤٥ يوماً وكانت أكثر وضوحاً عند المجموعة السابعة مقارنة مع المجموعة الخامسة والسادسة .

أما فيما يتعلق بمستوى الكلوتاثايون الذي يعد مضاداً للأكسدة فقد لوحظ وجود انخفاض معنوي عند المجموعة الثانية والثالثة والرابعة مقارنة بالمجموعة الأولى خلال الفترات ١٥ ، ٣٠ ، ٤٥ يوماً بينما أظهرت المجموعة الخامسة والسادسة والسابعة ارتفاع معنوي مقارنة بالمجموعة الثانية . كما وبينت النتائج وجود زيادة معنوية في مستوى المالونداياالديهايد (الذي يعد مؤشراً لزناخة الدهون) عند المجموعة الثانية والثالثة والرابعة ، بينما كان الانخفاض واضحاً عند المجموعة الخامسة والسادسة والسابعة ، وكانت أكثر وضوحاً عند المجموعة السابعة مقارنة بالمجموعة الخامسة والسادسة .

بينت نتائج الفحص النسجي المرضي في أبهر الجرذان عند المجموعة الثانية وجود تغيرات مرضية تمثلت بتكاثر شديد مع ضخامة الخلايا العضلية الملساء الوعائية (VSMC) بأتجاه البطانة يصاحبها تموضع للفجوات الدهنية ووجود الخلايا الرغوية (Foam Cells) في البطانة والطبقة المتوسطة فضلاً عن ضخامة خلايا البطانة وتكسر الألياف المطاطة ، هذه الآفات كانت أكثر وضوحاً عند المجموعة الرابعة مقارنة مع المجموعة الثانية والثالثة بينما اختزلت هذه الآفات عند المجموعة الخامسة والسادسة والسابعة عند مقارنتها مع المجموعة الثانية . ومن جانب أخر أظهرت نتائج الفحص النسجي للقلب تغيرات مرضية تمثلت بوجود التهاب شغاف القلب الإنمائي (Vegetative endocarditis) التي تتكون من تجمع للصفيحات الدموية والليفين واستيطان بكتيري عند فترة ١٥ يوم بعد الخمج يرافقها وجود النخر مع التغير الدهني وارتشاح الخلايا الالتهابية وحيدة النواة في عضلة القلب عند فترات ٣٠ ، ٤٥ يوماً بعد الخمج في المجموعة الثانية ، بينما لوحظ وجود التغير الدهني الشديد مع النخر فضلاً عن وجود الخثار في الشرايين التاجية عند المجموعة الرابعة .

وأخيراً بينت نتائج الفحص النسجي للكبد وجود البؤر النخرية يرافقها تجمع للجرثومة مرتشحة بالخلايا الالتهابية وحيدة النواة في المجموعة الثانية عند فترات ١٥ ، ٣٠ يوماً بعد الخمج بينما كانت الآفات أكثر شدة عند المجموعة الرابعة يرافقها تغير دهني شديد خلال الفترات ٣٠ ، ٤٥ يوماً بعد الخمج . أما عند المجموعة الخامسة والسادسة والسابعة فقد لوحظ اختزال للآفات المذكورة أنفاً عند الفترات ١٥ ، ٣٠ ، ٤٥ يوماً بعد الخمج .