

## CORELAȚII TOPOCHIMICE ÎN ȚESUTUL DE GRANULAȚIE ȘI EPITELIUL DIN PLAGILE CUTANATE LA ȘOBOLANII ALBI. FOSFATAZA ALCALINĂ ȘI ACIDUL RIBONUCLEIC

F. Wiener și M. Babonits

Corelația existentă între activitatea intensă a fosfatazei alcaline și celulele cu un conținut ridicat în acid ribonucleic (ARN), observată de mulți autori, a dus la emiterea ipotezei potrivit căreia fosfataza alcalină intervine și în sinteza proteinelor. (1—10). Cercetarea acestei corelații în procesul vindecării plăgilor prezintă un anumit interes, deoarece poate clarifica rolul jucat de acești componenți în procesele de regenerare și îndeosebi în sinteza proteinelor fibrilare, proces care stă la baza vindecării și cicatrizării rănilor.

### *Obiectul și metodele de cercetare*

Din pielea regiunii dorsale epilate a animalelor de experiență (șobolani albi de 200—250 gr) s-a excizat o bucată de 1 cm<sup>2</sup>. Baza plăgii era formată din resturi de fascii și țesut muscular. Macroscopic, vindecarea plăgilor s-a terminat în 15 zile. Pentru cercetarea microscopică a evoluției plăgii, s-a practicat excizia completă, cu țesutul subiacent și înconjurător al țesutului de granulație format la intervale de 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12, 15 zile. Țesutul excizat a fost fixat de obicei în Susa, alcool absolut, acetonă absolută și lichidul Carnoy. (11). Fosfataza alcalină a fost pusă în evidență prin metoda Gomori, modificată de Kabáth și Furlh (12), iar drept control au servit secțiuni care au fost incubate în soluții fără Na-B-glycerofosfat, sau enzima distrugându-se prin fierbere. Pentru detectarea ARN am folosit metoda lui Brachet cu verde de metil-pironină (13) și metoda lui Finarson (14) colorația chromalaun-galocianină. În ambele metode secțiunile de control au fost tratate cu ribonuclează preparată după metoda lui Roskin, pentru depolimerizarea ARN (11).

### *Observații microscopice*

În vederea localizării topochemice a componenților este necesar să descriem aspectele microscopice caracteristice dezvoltării țesutului de granulație.

A doua zi după excizia primară a plăgii, se observă formarea unor infiltrații perivascularare. După 5 zile, în țesutul de granulație se delimitează patru straturi distincte și anume: 1. *stratul leucocitar necrotic* sau crusta propriu-zisă; 2. *stratul superficial*, format

indeosebi din celulele migratoare ale țesutului de granulație; 3. *stratul vascular* caracterizat prin abundența capilarelor care datorită probabil factorilor hemodinamici din țesutul de granulație, prezintă o așezare verticală sau oblică; 4. *stratul profund*, bogat în fibre colagene cu un număr relativ redus de celule, care se găsesc îndeosebi la baza țesutului de granulație. În stadiile mai tardive de vindecare, această delimitare este și mai accentuată.

Epitelul regenerativ se îngroașă din ce în ce mai mult, ajungând să aibă 10—12 rânduri, despărțind crusta de țesutul de granulație. Regenerarea lui are loc dinspre marginea plăgii, începând cu primele zile de cicatrizare.

*Fosfataza alcalină.* În toate stadiile de cicatrizare, pe suprafața țesutului de granulație este dispus un strat leucocitar necrotic, de grosime dierită, prezentînd o activitate enzimică intens pozitivă. Țesutul de granulație infiltrat cu granulocite și alte elemente celulare, provenite în cea mai mare parte din sînge, prezintă o activitate enzimatică considerabilă. (Fig. 1).

În a 5-a zi de la excizie primară, în țesutul de granulație, se observă fenomene de maturizare. În stratul superficial de sub crustă, format îndeosebi din celulele migratoare, activitatea enzimică este deosebit de pronunțată la marginea plăgii, unde enzima se găsește și extracelular. În stratul vascular activitatea enzimică a celulelor migratoare este intens pozitivă. Se observă și o slabă activitate extracelulară (Fig. 2). Activitatea enzimică a celulelor endoteliale din capilare și din pereții arteriolelor, este intensă. În stratul profund bogat în fibre colagene, se observă 2—3 rânduri de celule cu o activitate enzimică pronunțată.

Din punct de vedere al activității enzimice epitelul regenerativ este negativ. În unele cazuri stratul bazal prezintă o slabă activitate enzimică, datorîndu-se probabil difuziunii enzimei din țesutul de granulație subiacent (Fig. 3).

După 5 zile, în activitatea enzimică a fosfatazei alcaline survin unele schimbări caracteristice. Țesutul de granulație complet epitelizat de la marginea plăgii nu mai prezintă activitate enzimică. Intensitatea maximă a activității enzimice se localizează în stratul vascular. Scăderea activității enzimice dinspre marginea plăgii spre centrul ei se accentuează, activitatea enzimică reducîndu-se din ce în ce mai mult la regiunile centrale ale plăgii (Fig. 4).

*Acidul ribonucleic.* Cantitatea ARN fiind legată de elemente celulare crește paralel cu formarea țesutului de granulație. Pe măsură ce țesutul de granulație se maturizează și se transformă în țesut cicatricial, cantitatea acestui acid scade.

În primele 2 zile celulele cu un conținut ridicat în ARN se găsesc într-un număr redus. În jurul vaselor se găsesc celule migratoare cu 2—3 nucleoli bogați în ARN. Se poate presupune că aceste elemente celulare sînt printre primele care iau parte în formarea țesutului de granulație.

În a 5-a zi de la excizia primară a plăgii, repartizarea ARN în țesutul de granulație prezintă două straturi bine distincte și anume: stratul superficial, cu un strat vascular bogat în celule și un conținut ridicat în ARN, și stratul profund, sărac în celule, avînd deci un conținut scăzut în ARN (Fig. 5). Demn de remarcat este faptul că celulele din stratul profund, deși puține la număr, conțin o cantitate însemnată de ARN (Fig. 6).

Mastocitele localizate în stratul profund într-un număr considerabil se colorează cu pironină. E foarte probabil că aceste celule conțin cantități infime de ARN; colorația este nespecifică, deoarece după tratarea lor cu ribonuclează nu-și pierd pironinofilia (Fig. 7).

După 5 zile de la excizia primară a plăgii, paralel cu formarea țesutului cicatricial, scade numărul celulelor și astfel și conținutul în ARN al țesutului de granulație. Intrucît procesul de cicatrizare are loc dinspre marginea plăgii spre centrul ei, scăderea cantității ARN se produce tot în acest sens. Spre sfîrșitul procesului de cicatrizare, ARN se limitează în celulele migratoare, care se găsesc într-un număr redus în jurul vaselor.

În epitelul neformat, stratul bazal și cel spinos conțin cantități considerabile de ARN. Pironinofilia din stratul granulos nu se datorează ARN, ci trebuie considerată un fenomen de absorbție al colorantului, fapt dovedit și prin metoda colorării cu chromalaungalocianină (Fig. 8).

## Interpretarea rezultatelor.

Din observațiile efectuate reiese că în procesul de vindecare a rănilor există o corelație strinsă între repartizarea și localizarea ARN pe de o parte, și activitatea fosfatazei alcaline pe de alta. Creșterea activității fosfatazei alcaline este paralelă cu creșterea cantității ARN.

La începutul procesului de cicatrizare, activitatea enzimatică în țesutul de granulație este redusă. Creșterea activității se observă în regiunile periferice ale plăgii și atinge punctul maxim, odată cu dezvoltarea stratului vascular, la nivelul acestui strat. Același fenomen se observă și în privința schimbărilor intervenite în repartizarea ARN. În primele stadii, ARN se găsește localizat în unele celule, mai târziu cantitatea lui crescând la marginile plăgii, pentru ca în stratul vascular să se găsească într-o proporție maximă.

În cursul procesului de cicatrizare, activitatea fosfatazei alcaline devine negativă în primul rând la marginea plăgii, deoarece colagenizarea, formarea țesutului cicatricial, se termină în primul rând în aceste regiuni. Paralel, se observă diminuarea cantității ARN, deoarece numărul celulelor în țesutul cicatricial se reduce în mod normal, scăzând implicit și cantitatea de ARN care este legată de elementele celulare.

În stratul profund al țesutului de granulație, cele 2—3 rinduri de celule prezintă o activitate fosfatazică intensă. Totodată și cantitatea ARN din celulele acestui strat este crescută considerabil, acestea având cea mai intensă pironofilie.

Corelația strinsă dintre aceste componente ale țesutului de granulație este în funcție în primul rând de activitatea lor metabolică.

În procesul cicatrizării rănilor, modificările metabolice ale țesutului de granulație și ale epitelului sînt îndreptate în ultimă instanță în direcția sintezării proteinelor celulare și fibrilare (colagene), necesare formării unui țesut conjunctiv cu structura specială a țesutului cicatricial.

Conform ipotezei lui *Borsook* (15) pentru sinteza proteinei se presupun necesare următoarele condiții: 1. activarea grupei carboxilice a aminoacizilor liberi; 2. transportul aminoacizilor activați la ARN unde ei se așează în ordinea alternanței lor specifice; 3. sinteza legăturilor peptidice la nivelul macromoleulei, ARN, după care proteina malformată se deslipește de pe suprafața ARN.

Activarea grupei carboxilice a aminoacizilor se realizează cu ajutorul energiei de scindare a legăturilor pirofosforice ale acidului adenozin-trifosforic. În scindarea acestor legături, fosfatazele ca hidrolaze joacă un rol de seamă. *Meyerhoff* și *Green* (15) au demonstrat prin utilizarea izotopului  $P^{32}$  că fosfatazele sînt capabile să asigure transferul de P (transfosforilaza) de la o moleculă donatoare (fosfocreatinina, glucozo-1-fosfat), la o moleculă acceptoare, îndeplinind astfel și rolul de fosfochinază. Recent, *Bresler* și *Rubina* (17) au demonstrat că ARN, datorită proprietăților sale macroergice, dobîndite prin fosforilare suplimentară, ia parte la reacțiile de sinteză ca un polimer analog acidului adenozin-trifosforic.

Fosfatazele ca eliberatoare de energie (hidrolaze) și transportori de grupări fosforice (transfosforilaze), ARN ca sursă de energie precum și rolul lui de seamă în sinteza legăturilor peptidice, demonstrează pe deplin că în cicatrizarea rănilor, paralelismul topochimic existent între aceste două componente nu este numai aparent, ci și causal.

Activitatea intensă a fosfatazei alcaline din celulele și straturile cu un conținut ridicat în ARN (cele 2—3 rinduri de celule din stratul profund al țesutului de granulație, stratul superficial și îndeosebi cel vascular, locul unde procesele metabolice din plagă au cea mai mare intensitate), sau lipsa acestei activități și a ARN din țesutul cicatricial pledează pentru rolul important al fosfatazei alcaline și al ARN în sinteza proteinei celulare și fibrilare. Ele pot fi



Fig. Nr. 1.



Fig. Nr. 2.



Fig. Nr. 3.



Fig. Nr. 4.



Fig. Nr. 1. — *Plagă de șobolan la 24 de ore. Fosfataza alcalină; metoda Gomori. Stratul leucocitar necrotic prezintă o reacție intens pozitivă. Majoritatea celulelor din țesutul de granulație edematos este pozitivă. Mărit de 66 x.*

Fig. Nr. 2. — *Plagă de șobolani la 5 zile, centrul plăgii. Fosfataza alcalină, metoda Gomori. Stratul leucocitar necrotic prezintă o reacție intens pozitivă. Activitatea enzimatică a celulelor migratoare este pozitivă. Se observă o slabă activitate extracelulară în jurul capilarelor neoformate. Mărit de 66 x.*

Fig. Nr. 3. — *Plagă de șobolan la 7 zile. Fosfataza alcalină; metoda Gomori. Epiteliul care se regenerează de la marginea plăgii nu prezintă activitate enzimatică. Slabă activitate din stratul bazal se datorește fenomenului difuziunii din țesutul de granulație subiacent intens pozitiv. Mărit de 66 x.*

Fig. Nr. 4. — *Plagă de șobolan la 7 zile, centrul plăgii. Fosfataza alcalină; metoda Gomori. Activitatea enzimatică este deosebit de intensă în țesutul de granulație neoformat. Mărit de 66 x.*

Fig. Nr. 5. — *Plagă de șobolan, la 5 zile. Colorație: chromalaungallicianină. În stratul vascular se pun în evidență cantități mari de ARN în fibroblaste și histiocite. Mărit de 310 x.*

Fig. Nr. 6. — *Plagă de șobolan la 5 zile. Colorație: chromalaungallicianină. Rinduri rare de celule în stratul profund al țesutului de granulație, cu un conținut ridicat în ARN. Mărit de 310 x.*

Fig. Nr. 7. — *Plagă de șobolan la 5 zile. Secțiune de control tratată cu ribonuclează. Colorație: verde de metil-pirorină. Pseudoreacție pozitivă și degranularea mastocitelor din țesutul de granulație. Mărit de 740 x.*

Fig. Nr. 8. — *Plagă de șobolan la 5 zile. Colorație: chromalaungallicianină. Stratul bazal al epitelului care regenerează, conține ARN în cantități mai mari. Cantitatea de ARN descreește spre stratul spinos. Mărit de 310 x.*



Fig. Nr. 5.



Fig. Nr. 6.



Fig. Nr. 7.



Fig. Nr. 8.



Iolosite ca teste relativ obiective în aprecierea dinamismului de vindecare a plăgilor.

În privința lipsei fosfatazei alcaline din epiteliul regenerativ bogat în ARN, s-ar putea emite ipoteza, după care sinteza proteinei fibrilare specifice epiteliului (keratina) nu necesită participarea acestei enzime.

*Sosit la redacție: 19 noiembrie 1959.*

#### *Bibliografie*

1. B. V. CHEDROVSKI: *Uspeshi Sovrem. Biol* 32, 309 (1951); 2. R. TSANEV: *Izvest. Inst. Morf.* 1, 189 (1953); 3. E. B. DIMITRIEVA: *Dan SSSR* 98, 653 (1954); 4. T. M. JACOVLEVA: *DAN SSSR* 83, 469 (1952); 5. L. B. LEVINSON, M. N. PAVLOVA: *DAN SSSR* 69, 430 (1952); 6. L. B. LEVINSON, Z. P. KARAIŠKAIA: *DAN SSSR* 58, 2067 (1957); 7. J. BRACHET: *Symp. Soc. Ex. Biol.* 1, 207; 8. J. R. G. BRADFIELD: *Quaert. J. Micr. Sci.* 92, 87 (1951); 9. T. CASPERSSON: *Cell Growth and cell function.* Norton 19550; 10. L. E. TOLUISIS: *Biochimija* 23, 194 (1958); 11. *Tehnica histopatologică.* Edit. Stat. Lit. Științifică București (1953); 12. E. KABATH, J. FURTH: *Amer. J. Path* 17, 303 (1941); 13. J. BRACHET: *C. R. Soc. Biol.* 133, 88 (1940); 14. L. FINARSON: *Acta Path. Microbiol. Scand* 28, 82 (1951); 15. H. BORSOOK: *J. Cell. Comp. Physiol.* 41, Suppl. 1, 35 (1956); 16. D. MEYERHOF, H. GREEN: *J. Biol. Chem* 183, 377 (1950); 17. BRESSLER S. E., H. M. RUBINA: *Biochimija* 20, 20 (1955).

### ТОПОХИМИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ В ГРАНУЛЯЦИОННОЙ ТКАНИ И ЭПИТЕЛИИ РАНЫ КОЖИ БЕЛЫХ КРЫС

#### II. Щелочная фосфатаза и рибонуклеиновая кислота

Винер Ф., Бабонич М.

Авторы наблюдали, что имеется тесная взаимосвязь между активностью щелочной фосфатазы и количеством рибонуклеиновой кислоты в грануляционной ткани раны кожи крыс. Объясняют это тем, что исследуемые вещества имеют значение в обменном процессе грануляционной ткани.

Клетки и слои имеют выраженную фосфатазоактивность а также содержат большое количество рибонуклеиновой кислоты.

Эта тесная взаимосвязь между компонентами грануляционной может служить объективным тестом при оценке процесса заживления ран.

### CORRÉLATIONS TOPOCHIMIQUES DANS LE TISSU DE GRANULATION ET DANS L'ÉPITHÉLIUM DES PLAIES CUTANÉES CHEZ LES RATS BLANCS. LA PHOSPHATASE ALCALINE ET L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE

F. Wiener, M. Babonits

Au cours de leurs expériences sur des rats blancs, les auteurs ont observé que dans le tissu prolifère des plaies cutanées il y a un parallélisme serré entre l'activité de la phosphatase alcaline et la quantité d'ARN. Ce phénomène s'explique par le rôle de ces substances dans le métabolisme du tissu prolifère. Les cellules et les couches qui ont manifesté une activité phosphatasique marquée ont contenu en même temps une grande quantité d'ARN. Le parallélisme étroit constaté entre ces composants du tissu prolifère pourrait servir comme un test dans l'appréciation des processus de guérison.