

EFFECTUL INSTILAȚIILOR CU A.D.N. ÎN ARSURILE CORNEENE PRIN AGENȚI CHIMICI

Doina Pop D. Popa, V. Săbădeanu, Gh. Kemény, Agneta Szövérfi, G. Voloc

Arsurile corneene—conjunctivale, prin frecvența, gravitatea și consecințele lor nefaste, fac ca terapia lor să fie în continua atenție a oftalmologilor.

În lucrarea de față ne-am propus să urmărim efectul instilațiilor cu A. D. N. uman, înalt polimerizat, biologic activ, asupra refacerii epitelului corneean de iepure în arsurile experimentale cu NaOH 10% și CIH 10% cunoscând acțiunea favorabilă a acestuia în refacerea și ameliorarea troficității corneene.

Metoda de lucru:

După o prealabilă aneestezie am provocat arsuri corneene la ambii ochi al iepurelui prin aplicarea pe corneea a unui trepan cu diametrul de 7 mm. în care s-a introdus un tampon de vată imbibată în soluția chimică utilizată. În cele mai multe cazuri am obținut o eroziune delimitată, cu excepția unora obținute cu NaOH, care s-au extins și în părțile învecinate. Eroziunile, cât și progresiunea epitelizării au fost urmărite prin colorare cu fluoresceină sodică 2%. La fiecare iepure un ochi a servit ca martor, iar celălalt a fost tratat cu A.D.N. uman, înalt polimerizat, sub formă de instilații cite 2 picături zilnic, 4 zile imediat după provocarea arsurii, la 24, 48 și 72 de ore. Ochiul martor a fost tratat cu vehiculul substanței (ser fiziologic) la aceleași intervale de timp.

Progresiunea epitelizării a fost urmărită prin colorare cu fluoresceină sodică 2% la intervale de 6, 24, 28, 34, 48, 56, 70 și 94 ore de la producerea arsurii și aplicarea primei instilații de A. D. N.

Observând că epitelizarea nu progresa în mod uniform circular, am măsurat la fiecare control diametrele extreme ale zonei dezepitelizate în timp și am redat-o prin grafice în a căror construcție s-a considerat pe abscisă timpul și pe ordonată media la diferite ore a produsului diametrelor.

Tabelul nr. 1 a.

Diametrele zonei dezepitelizate la ochii tratați cu ADN și la martori în arsurile cu NaOH

R Animalul	Ochiiul tratat						Ochiiul martor									
	6 ore	24 ore	28 ore	34 ore	48 ore	56 ore	70 ore	94 ore	6 ore	24 ore	28 ore	34 ore	48 ore	56 ore	70 ore	94 ore
1	8 7	7,50 3,50	7 2	6,50 6	—	—	—	—	8,25 7,25	9 7	9 4	7 4	3 2	2 1	1 1	—
2	5,50 5,50	1,25 1,25	0,75 0,75	0,50 0,25	—	—	—	—	9 8	5 4	5 4	4 4	5 4	3,50 4	3 2	3 2
3	5,50 5,50	2,50 2	2 2	—	—	—	—	—	6 6	2 2	1 1	1 1	1 1	0,25 0,25	—	—
4	9 7	4,50 3	3 2,5	3 1	—	—	—	—	10 7	8 6,50	7 5	6 4	3,50 2	2 1,50	—	—
5	8 7,50	6 4	5 2	3 2	—	—	—	—	9 8	7 5	5 4	4 2	0,50 0,50	—	—	—
6	9 8,50	9 7,50	6 5	6 4	4 3	4 3	—	—	9 9	9 9	8 8	7 8	6 8	5 4,5	4 4	—
7	7 7	4,50 3,50	4 3	3 2	0,10 0,10	—	—	—	7 7	5 4	4 2,50	4 2	—	—	—	—
8	8 7,50	5 4	5 4	4 3	2 1	1 0,50	—	—	10 8	6 6	7 5	6 5	4 3	3 2,50	1 1	—
9	7 7	5 4	4 4	4 3	1 1	—	—	—	7 5	3 3	3 3	1,50 1,50	—	—	—	—
10	7 6	4 3	4 2	3,50 2	—	—	—	—	7 7	4 3	3 2	3 2	—	—	—	—

Tabelul nr. II a.

Diametrele zonei dezepitelizate la ochii tratați cu ADN și la martori în arsurile cu CIH.

Animalul	Ochiul tratat										Ochiul martor									
	6 ore	24 ore	28 ore	34 ore	48 ore	56 ore	70 ore	94 ore	6 ore	24 ore	28 ore	34 ore	48 ore	56 ore	70 ore	94 ore				
1	8	8	8	6	7	6	5	5	9	7,50	9	8	3	—	—	—				
	7	7	7	6	3	3,50	3	2	8	7	7	5	1	—	—	—				
2	6,50	7	7	6	4	—	—	—	6,50	7	5	4,50	—	—	—	—				
	6,50	6,50	6	6	2	—	—	—	6,50	7	6,50	6	—	—	—	—				
3	7	6,50	6,50	6	6	6	5	3	7	7	4,50	4	3	—	—	—				
	6,50	5,50	6	5	2,50	2	1,50	1	7	6	4	4	3	—	—	—				
4	6,50	7,50	8	8	5	5	4	3	7	7	7	7	4	—	—	—				
	6,50	7	7	6	5	3	2,50	2	7	7	7	6	2	—	—	—				
5	7	7	7	7	4	2,50	—	—	6,50	8	5	4	4	—	—	—				
	6,50	7	4	4	3,50	1,50	—	—	5	6,50	4,50	4	3	—	—	—				
6	7	6	5	5	3	3	—	—	8	8	6	6	5	—	—	—				
	7	5	4	3	1,50	2	—	—	6,50	6	5	6	4	—	—	—				
7	8	8	7	5	2	—	—	—	10	10	9	7	7	4	—	—				
	8	7	6	5	2	—	—	—	9	9	5	7	7	4	—	—				
8	6	5	4	2	—	—	—	—	6	6	6	6	4	3	—	—				
	5,50	3	2	2	—	—	—	—	6	5	5	5	4	1	—	—				
9	7,50	6	6	4	1	4	—	—	7,50	6	6	5	—	—	—	—				
	7,50	6	6	4	1	2	—	—	7,50	6	5	3	—	—	—	—				
10	5,50	5	6,50	6	3	1	—	—	7	6	5	6	2	—	—	—				
	5	4	4	4	2,50	1	—	—	6	5	4	4	1,50	—	—	—				

Datele experimentale au fost prelucrate statistic, folosindu-se testul t, metoda cuplurilor (Marc Steinbach). Rezultatele macroscopice au fost confirmate și prin examene histologice.

Rezultatele obținute în cazul arsurilor cu NaOH 10%.

Datele obținute la un lot de 10 iepuri sînt prezentate în tabelul 1 a, din care reiese că la ochiul martor epitelizarea s-a terminat în 3 cazuri la 48 ore, într-un caz la 56, în 2 cazuri la 70, în 3 cazuri la 94 și în unul după 94 de ore, pe cînd la ochiul tratat epitelizarea s-a încheiat într-un caz la 34 de ore, în 6 cazuri la 48, în 2 cazuri la 56 și într-un caz după 56 de ore. Ilustrarea grafică a epitelizării la ochii martori și la cei tratați este redată în graficele de mai jos la a căror întocmire s-a considerat pe abscisă timpul și pe ordonată media pentru diferitele ore ale mediilor diametrelor (fig. 1 a), respectiv media la diferitele ore ale produselor diametrelor (fig. 1 b).

Prelucrarea statistică a datelor în ce privește semnificația diferenței dintre media valorilor pentru ochiul tratat și media valorilor pentru ochiul martor este redată în tabelul nr. 1 b.

Tabelul nr. 1 b

	6 ore	24 ore	28 ore	34 ore	48 ore	56 ore
Pentru media diam.	nu	da prag. 5%	nu	nu	da prag. 2%	da prag. 5%
Pentru prod. diam.	nu	da prag. 5%	da prag. 5%	nu	nu	da prag. 5%

Rezultatele obținute în cazul arsurilor cu ClH 10%.

Din tabelul II a, cuprinzînd datele obținute pe cite un lot de 10 iepuri, reiese că la ochiul martor epitelizarea s-a terminat în 2 cazuri la 48 de ore, în 6 cazuri la 56 de ore și în alte 2 cazuri după 56 de ore, pe cînd la ochiul tratat epitelizarea s-a încheiat abia într-un singur caz la 48 ore, în 2 cazuri la 56, în 4 cazuri la 70 și în 3 cazuri numai după 94 de ore.

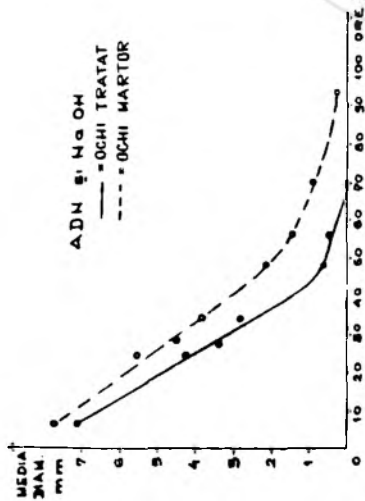
Pentru a avea o imagine mai clară a procesului de epitelizare și în acest caz, am redat evoluția plăgilor în timp prin grafice, care reprezintă pe abscisă timpul, iar pe ordonată media la diferite ore ale mediilor diametrelor (fig. II a), respectiv media la diferitele ore ale produselor diametrelor (fig. II b).

Prelucrarea statistică a acestor date pentru semnificația diferenței dintre media valorilor pentru ochiului tratat și pentru cel martor este cuprinsă în tabelul II b.

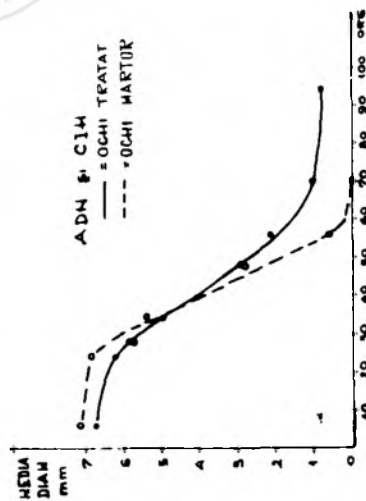
Tabelul nr. II b

	6 ore	24 ore	28 ore	34 ore	48 ore	56 ore
Pentru media diam.	nu	da prag. 5%	nu	nu	nu	nu
Pentru prod. diam.	nu	da prag. 5%	nu	nu	nu	nu

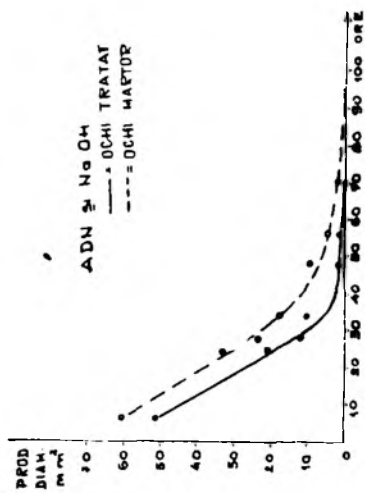
DOINA POP D. POPA ȘI COLAB. EFECTUL INSTILĂVIILOR CU A. D. N. ÎN ARSURILE
CORNEENE PRIN AGENTII CHIMICI



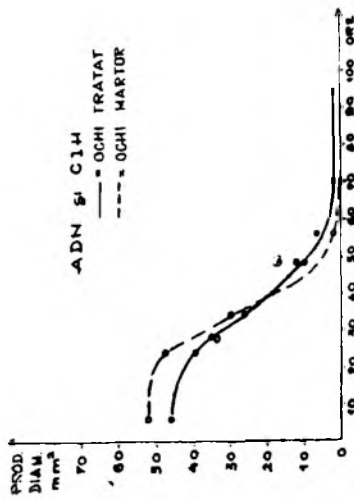
Graficul nr. 1 a.



Graficul nr. 2 a.



Graficul nr. 1 b.



Graficul nr. 2 b.





Fig. nr. 1.

Fig. nr. 1.: Arsură provocată cu NaOH 10% pe corneea unui iepuru la 94 de ore după intervenție. Sub teritoriul decalcificat în stromă se observă o infiltrație rotundocululară și o înmulțire a fibroblastelor. Colorație H.E., Ob. 20 X, Oc. 15 X

Fig. nr. 2.: Corneea arsă cu NaOH și tratată cu ADN uman. Cu 94 de ore după arsură și 24 de ore după ultima instilație cu ADN, epitelul refăcut este subțire, stroma are un aspect normal. Colorația H.E., Ob. 20 X, Oc. 15 X.

Fig. nr. 3.: Corneea prezentată pe microfotografia nr. 1 în care s-a pus în evidență fosfatază alcalină cu metoda Gômori. În stromă se văd numeroase celule prezentând activitate enzimatică, epitelul lipsește. Ob. 40 X, Oc. 15 X



Fig. nr. 2.



Fig nr. 3.





Fig. nr. 4.

Fig. nr. 4.: Corneea arsă cu NaOH și tratată cu ADN. Fosfatază alcalină cu metoda Gômöri. Epiteliul regenerat este subțire și prezintă o activitate enzimatică intensă. În stromă puține celule active. Ob. 40 X, Oc. 15 X

Fig. nr. 5.: Corneea arsă cu ClH 10% cu 94 de ore după intervenție. Stromă e liniștită, epiteliul regenerat este subțire. Colorație. Ob. 10 X, Oc. 15 X

Fig. nr. 6.: Corneea arsă ca cea precedentă și tratată cu instilații de ADN uman. Nu se observă diferențe apreciabile în structura histologică a celor două cornee. Colorație H.E., Ob. 10 X, Oc. 15 X

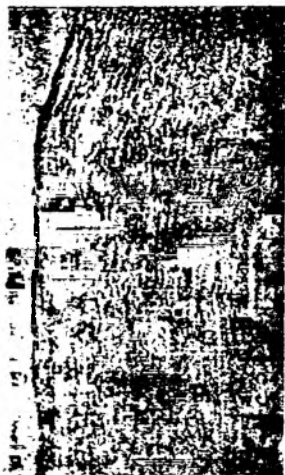


Fig. nr. 5.

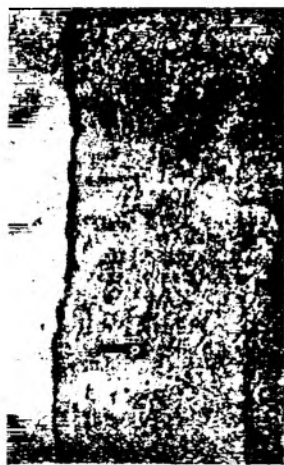


Fig. nr. 6.



DOINA POP D. POFA ȘI COLAB.: EFECTUL INSTILAȚIILOR CU A. D. N. ÎN ARSURILE
CORNEENE PRIN AGENȚI CHIMICI

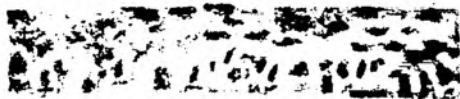


Fig. nr. 7.: Corneea normală de iepure. Colorație H.E.,
Ob. 40 X Oc. 15 X



Fig. nr. 8.: Corneea normală de iepure. Fosfatază alcalină cu metoda Gömöri. Ob. 40 X, Oc. 15 X

La examenul histologic executat din preparate provenite din corneea ochiului martor și corneea tratată, remarcăm faptul că instalațiile cu A.D.N. uman au avut efect favorabil asupra reepitelizării corneei. În cazul arsurilor cu NaOH 10% la 94 de ore după producerea arsurii și cu 24 de ore după ultima instalație cu A.D.N. se constată că epiteliul a acoperit complet teritoriul atins de arsură. Acest epiteliu e subțire fiind format din numai 1—3 rinduri de celule turtite. Stratul superficial al epiteliului este bogat în fosfatază alcalină, iar în stromă celulele conjunctive cu conținut de fosfatază sînt rare. Dimpotrivă, ochiul martor (arsură cu NaOH netratată cu ADN) prezintă încă zone deepitelizate. La nivelul acestor teritorii stroma este bogată în celule conjunctive active în care și reacția fosfatazică este prezentă (*microfotografie* 1, 2, 3 și 4). Este interesant că în cazul arsurilor produse cu acid clorhidric, tratamentul cu A. D. N. nu a fost la fel de eficient. Reepitelizarea plăgii s-a produs cu oarecare întârziere la ochii tratați cu A. D. N. Totuși, se pare că în 94 de ore de la arsură, teritoriile neepitelizate sînt mai mici la ochiul tratat decît la cel netratat. Epiteliul format este foarte subțire la ambii ochi (*microfotografie* 5 și 6). În ce privește stroma, diferențele dintre ochii tratați și cel netratat nu au fost apreciabile, la ambele grupe stroma a fost săracă în celule. Stroma a suferit puțin în urma instalației de acid clorhidric și din această cauză nu a apărut nici procesul de cicatrizare.

Ținînd cont de observațiile directe, de aspectul graficelor, de rezultatul calculului statistic, de examenul histologic, se poate contura următoarea apreciere în evoluția comparativă a proceselor de epitelizare în cazurile de mai sus.

În cazul arsurilor cu NaOH 10%, tratamentul cu A. D. N. are la început un efect favorabil, diferența dintre dimensiunile ariilor neepitelizate la ochii tratați și la ochii martori devenind semnificativă statistic după aproximativ 24 de ore, semnificație ce se accentuează după aproximativ 48 de ore, efectul A.D.N. ducînd la vindecarea evident mai rapidă a ochiului tratat față de ochiul martor.

În cazul arsurilor cu ClH 10% tratamentul cu A. D. N. are la început un efect favorabil, (cum reiese din tabelele II a și II b) diferența dintre dimensiunile plăgilor la ochiul tratat și la ochiul martor devenind semnificativă statistic după aproximativ 24 de ore, dar acest efect este anihilat ulterior, în continuare cons. atîndu-se chiar o prelungire a perioadei de vindecare a ochiului tratat față de ochiul martor. Această ultimă observație poate constitui un indiciu probabil pentru faptul că A. D. N. în cazul arsurilor cu acid clorhidric are, din acest punct de vedere, un efect defavorabil. Acest efect mai puțin favorabil s-ar putea explica printr-o inactivare a A. D. N. sub influența pH acid. *Oancea și Vasincă* au arătat că la suprafața corneo-conjunctivală a iepurilor sănătoși pH este 7. În cazul arsurilor cu NaOH avem o creștere a pH, iar în cazul arsurilor cu ClH o scădere a acestuia.

Cercetările lui *Pauling* și *Corey*, cît și ale lui *Watson* și *Crick* au dus la presupunerea unei structuri în spirală a moleculelor de A. D. N. Conform modelului structural al lui *Watson* și *Crick*, moleculele de A. D. N. ar fi formate dintr-o spirală dublă din două lanțuri răsucite de polinucleotide care se înfășoară în jurul unei axe comune, în care sistemele inelare ale bazelor purinice și pirimidinice sînt așezate transversal pe axa spiralei, iar punțile H ale bazelor cu direcția spre interior asigură stabilitatea acestui sistem structural.

Intra-adevăr *Gulland, Jordan* și *Taylor* (1947) au constatat cu ocazia cercetărilor electrometrice de titrare a soluțiilor de A.D.N. în medii slab alcaline, respectiv slab acide, eliberarea unei grupări titrabile, pe care o explică prin scindarea punților H intra-respectiv intermoleculare.

Romhányi și Jobst au arătat că în urma tratării cu acizi slabi, dubla refracție proprie a A. D. N. dispare, fapt care este în legătură cu dezorientarea intramoleculară a inelelor de bază nucleotide ale moleculei de A. D. N. Această modificare structurală intramoleculară are loc la un pH critic de 3,3 și este la început reversibilă, însă la un pH de 2,5 devine deja ireversibilă.

În fine, A. D. N. prezintă față de Beta-glucuronidază o acțiune complexă care depinde de pH. Dacă $\text{pH} = 4,5$ A. D. N. activează Beta-glucuronidaza, iar dacă coborârea la 4, efectul este inversat și A. D. N. devine inhibitor al activității enzimactice.

Se pare deci că stabilitatea structurală a A. D. N. și posibil, chiar și gradul de polimerizare să depindă de orientarea transversală a bazelor nucleotidice susținute prin punțile H și mai departe, că acest raport interesant în structura A. D. N. joacă un rol important în procesele biologice cu care acidul nucleic se află în relație mai ales în procesele de reproducere ale proteinelor care sînt reglate prin A. D. N.

În acest mod ne putem explica efectul mai puțin favorabil al A. D. N. în cazul arsurilor cu ClH.

În lucrări anterioare (3,5) am arătat că A. D. N. uman, înalt polimerizat, biologic activ, instilat în soluție pe cornee favorizează în mod evident procesul de vindecare a unor afecțiuni corneene umane. Într-o altă lucrare am urmărit pe iepuri efectul aceleiași substanțe asupra refacerii epitelului corneean, lezat mecanic, constatînd că A. D. N. provoacă o accelerare semnificativă a procesului de epitelizare în comparație cu ochiul martor. Rezultatele macroscopice au fost confirmate și prin examene histologice.

Concluzii

Am cercetat acțiunea A. D. N. uman înalt polimerizat asupra arsurilor corneene provocate cu acid clorhidric 10%, respectiv hidroxid de sodiu 10%, la două loturi de iepuri de cîte 10 animale. Instilațiile de A. D. N. au avut un efect favorabil asupra reepitelizării corneene în arsurile experimentale cu NaOH efect urmărit macroscopic prin colorare cu fluoresceină sodică 2% și demonstrat histologic. Datele au fost prelucrate statistic. În arsurile cu ClH tratamentul aplicat a favorizat reepitelizarea în primele 24 de ore dar mai tîrziu diferențele între ochii tratați și cei martori nu au mai fost apreciable nici histologic și nici statistic.

Sosit la redacție: 11 iunie 1968.

Bibliografie

1. HUANT ERNEST: A. D. N. Recherches expérimentales et cliniques. Editions Doin, 1964, 43;
2. OANCEA I., VASINCA M.: Oftalmologia (1967), 1, 17;
3. POP D., POPA DOINA, SĂBĂDEANU V.: Rev. Med. (1965), 11, 1, supl. pag. 14;
4. POP D., POPA DOINA, SĂBĂDEANU V.: Rev. Med. (1965), 11, 2, 159;
5. POP D., POPA DOINA, SĂBĂDEANU V.: Rev. Med. (1966), 12, 1, 29;
6. ROMHÁNYI GEORG, KASIMIR JOBST: Acta histochemica, Ed 3, 308;
7. STEINBACH M.: Prelucrare statistică în medicină și biologie. Ed. Acad. R.P.R., 1961, 237.