

EFACTUL INSTILAȚIILOR DE ADN UMAN ÎNALT POLIMERIZAT ASUPRA REFACERII EPITELIULUI CORNEEAN LA IEPURE

Doina Pop D. Popa, V. Săbădeanu

Intr-o lucrare anterioară (notă preliminară) am arătat că ADN uman înalt polimerizat, biologic activ, instilat în soluție pe corneea favorizează în mod evident procesul de vindecare a unor afecțiuni corneene. Pe lângă cele 4 cazuri descrise în lucrarea amintită, urmărim acțiunea acestei substanțe pe un număr mai mare de bolnavi, suferind îndeosebi de keratite virotice. Rezultatele obținute confirmă pri-mele noastre constatări.

Datele din literatura de specialitate arată că acidul dezoxiribonucleic crește vădit în cursul regenerării celulare, mai ales în perioada de dediferențiere și de creștere (V. Preda, 3), înmulțirea cromozomilor fiind însoțită de sinteză de ADN (Davidson și Howard, citați de Mazia, 1). În intervalul dintre diviziunile cariochi-netice sau cel mai târziu în profaza timpurie are loc dedublarea cantității de ADN necesară trecerii celulelor la diviziune. Odată cu apariția mitozelor cantitatea de ADN revine la normal sau scade sub această valoare datorită repartiției în celu-lele fiice. B. Thorrel (5) arată că cea mai mare parte a ADN este sintetizată la începutul fiecărei diviziuni.

Datorită acestor considerente bibliografice pe de o parte, iar pe de altă parte pentru a veni prin constatări experimentale în sprijinul observațiilor noastre cli-nice, ne-am propus să urmărim acțiunea ADN-ului uman înalt polimerizat asupra procesului de refacere a epiteliului corneean lezată la iepure.



Metoda utilizată de noi a constat în producerea unei dezepitelizări mecanice cu ajutorul unei chiurete sub controlul lupei, în partea centrală a corneei, pe o suprafață circulară cu un diametru de 7,5 mm, delimitată cu ajutorul unui trepan introdus în fluoresceină. Astfel am îndepărtat uniform și în întregime epiteliul corneean. Am aplicat pe câte unul din ochii fiecărui iepure ADN uman înalt poli-

merizat sub formă de soluție instilată (odată pe zi cite 3—4 picături, timp de 3 zile, imediat după dezepitelizare, apoi la 24 și 48 de ore). Celălalt ochi servindu-ne drept martor, a fost tratat la aceleași intervale cu vehiculul substanței (ser fiziologic).

Am controlat progresiunea epitelizării prin colorarea cu fluoresceină la intervale de 6, 12, 24, 30, 36, 48, 56, 72 de ore de la dezepitelizare și de la aplicarea primei doze terapeutice de ADN. Observînd că epitelizarea nu progresează în mod uniform circular, am măsurat la fiecare control diametrele extreme ale zonei încă neepitelizate.

Rezultate. La o serie de 10 iepuri am constatat că ritmul de epitelizare la ochiul martor corespundea datelor descrise în literatură. În cursul primei 6 ore nu am constatat modificări apreciabile. Începînd de la 30 de ore am remarcat o accelerare a procesului de epitelizare care s-a terminat într-un caz la 48 de ore, în 2 cazuri la 56 de ore și în 7 cazuri la 72 de ore. Față de acestea am constatat că epitelizarea sub acțiunea ADN s-a produs mai repede în toate cazurile, la 48 de ore în 4 cazuri și la 56 de ore în 6 cazuri (tabelul nr. 1). Mai pronunțate sînt diferențele înregistrate între ochiul martor și cel tratat la 36 de ore după raclarea corneei. Valorile obținute la acest interval ne-au servit pentru prelucrarea statistică a rezultatelor înregistrate.

Am luat diferența de reacție de la cei doi ochi ai fiecărui animal drept bază de analiză statistică. Cele două valori măsurate au fost folosite sub forma mediei celor două diametre și sub forma produsului lor.

Dăm în tabelul nr. 2. media și produsul diametrelor după 36 ore, ca și diferențele între ochii tratați și cei martori.

Se constată că media diametrelor zonei dezepitelizate a ochilor martori e cu 1,137 mm mai mare decît a ochilor tratați. Cît despre produsul diametrelor, diferența medie între cei doi ochi este de 8,532.

Pentru a constata dacă diferențele între rezultatele obținute prin aplicare de ADN și cele obținute fără tratament sînt semnificative, am folosit testul *t* metoda cuplurilor (Marc Steinbach) (4). Am obținut pentru media diametrelor valoarea $t = 4,09$ și pentru produsul diametrelor valoarea $t = 4,31$. Deci în ambele cazuri diferențele sînt semnificative, pentru că valorile obținute pentru t depășesc pragul $t = 0,01$ în primul caz și $t = 3,25$ în al doilea.*

Putem afirma deci că ADN provoacă o accelerare semnificativă a procesului de epitelizare în comparație cu ochiul martor.

Rezultatele noastre macroscopice au fost confirmate și prin examene histologice (efectuate cu concursul lui Gh. Kemény și A. Szövérfi de la Catedra de histologie).

După terminarea epitelizării (la 72 ore) s-au făcut secțiuni atît din corneea ochiului martor cît și a celui tratat, care au fost fixate în alcool sau formaiina și colorate cu hematoxilină-eozină. S-a constatat că corneea ochilor martori prezintă un epiteliu în general de aspect normal dar mai subțire, mai plat și cu un număr mai mic de celule decît cel al corneei ochilor tratați. Din contră, la ochii tratați epitelizarea este mult mai completă. Epiteliul este alcătuit din 4—5 rînduri de celule, iar stratul bazal este alcătuit din celule mai înalte decît la cei martor.

Testul fosfatazei alcaline (metoda Gomori) pune în evidență activitate enzimatică pronunțată în ambele cazuri. În cazul ochiului tratat stratul superficial, intens activ, mai subțire decît în corneea ochiului martor, ceeace este în concordanță cu datele din literatură care arată că creșterea fosfatazei alcaline este paralelă cu creșterea ARN-ului și antagonistă cu cea a ADN-ului (Wiener F., 6).

* Prelucrarea datelor statistice prin metoda matematică a fost făcută de către matematicianul Voloc Nicolae, de la Catedra de biofizică a I.M.F. Tg.-Mureș.



Fig. nr. 1.



Fig. nr. 2.



Fig. nr. 3.



Fig. nr. 4.





Fig. nr. 5.



Fig. nr. 6.



Fig. nr. 7.



Fig. nr. 8.



DOINA POP D. POPA, V. SĂBĂDEANU: EFECTUL INSTILAȚIILOR
DE ADN UMAN ÎNALT POLIMERIZAT ...

Fig. nr. 1.: Ochiul martor al iepurelui Nr. 3 sacrificat la 72 de ore de la dezepitelizarea corneei. Epiteliul este format din numai 3 rinduri de celule, stratul bazal fiind mai turtit. (Ob. 25X, Oc. 15X). Col. H. E.

Fig. nr. 2.: Ochiul tratat cu ADN al iepurelui Nr. 3 sacrificat la 72 de ore de la dezepitelizarea corneei. Epiteliul corneei este mai gros decât la ochiul martor, are 5 rinduri de celule, structura lui fiind normală (Ob. 25 X, Oc. 15 X). Col. H. E.

Fig. nr. 3.: Secțiunea executată în corneea iepurelui Nr. 3; ochiul martor. Fosfatază alcalină, metoda Gömöri. Epiteliul este subțire, stratul celulelor superficiale prezintă o activitate enzimatică pronunțată, dar enzima apare în formă de granulații și în citoplasma celulelor bazale. Culoarea nucleară s-a dovedit a fi artefact: apare și în secțiunile incubate fără substrat. (Ob. 25 X, Oc. 15 X).

Fig. nr. 4.: Corneea ochiului tratat cu ADN a iepurelui Nr. 3. Fosfatază alcalină, metoda Gömöri. Epiteliul de grosime normală prezintă granule fosfatazice în straturile profunde. Celulele superficiale sînt foarte bogate în fosfatază, dar stratul superficial intens activ este mai subțire decât la corneea ochiului martor. (Ob. 25 X, Oc. 15 X) (epiteliu refăcut, nu mai prezintă semne de proliferare).

Fig. nr. 5.: Corneea ochiului martor la 72 de ore după raclare (iepurele Nr. 8). Epiteliul este subțire, celulele stratului bazal sînt cubice sau turtite. Col. H. E. (Ob. 25 X, Oc. 15 X).

Fig. nr. 6.: Corneea ochiului tratat cu ADN la 72 de ore după dezepitelizare (iepurele Nr. 8). Stratul bazal al epitelului este constituit din celule mai înalte decât la ochiul martor. În unele locuri se văd 4-5 rinduri de celule față de cele 3 existente la corneea ochiului martor. Col. H. E. (Ob. 25 X, Oc. 15 X).

Fig. nr. 7.: Ochiul martor al iepurelui Nr. 4. La acest animal la 72 de ore după raclarea corneei, am găsit la examenul microscopic încă o mică porțiune în curs de epitelizare. În imagine am prins zona de înaintare a epitelului. Este de remarcat bazofilia intensă a celulelor în curs de proliferare. Epiteliul este format la acest nivel din 3-4 rinduri de celule turtite. Col. H. E. (Ob. 25 X, Oc. 15 X).

Fig. nr. 8.: Ochiul tratat al iepurelui Nr. 4 la 72 de ore după raclarea corneei. Imaginea microscopică a porțiunii în curs de epitelizare evidențiază zona de înaintare a epitelului care prezintă o bazofilie pronunțată. Celulele epiteliale aranjate în 5-6 rinduri sînt înalte, procesul de proliferare apărînd mult mai activ. Col. H. E. (Ob. 25 X, Oc. 15 X).

Tabelul 1.
Diametrele zonei dezepitelizate la ochii tratați cu ADN și la ochii martori de iepure

Animalu nr.	Ochiul tratat								Ochiul martor							
	6 ore	12 ore	24 ore	30 ore	36 ore	48 ore	56 ore	72 ore	6 ore	12 ore	24 ore	30 ore	36 ore	48 ore	56 ore	72 ore
1.	7,50	7,00	5,50	4,00	2,25	2,00	—	—	7,00	6,25	6,25	6,00	5,00	3,00	1,00	—
	7,50	6,50	6,25	5,00	2,25	1,00	—	—	7,00	6,00	6,00	4,00	4,00	2,00	1,00	—
2.	7,25	7,25	7,25	5,50	5,00	3,00	—	—	7,00	7,00	7,00	5,50	5,00	3,00	1,00	—
	7,00	7,00	7,00	5,50	3,50	2,00	—	—	7,00	6,75	6,75	5,50	4,25	3,00	1,00	—
3.	7,50	7,00	6,00	5,00	4,00	—	—	—	7,50	7,00	5,25	5,00	4,00	1,00	—	—
	7,00	6,50	5,25	4,00	4,00	—	—	—	7,50	7,00	5,00	4,00	4,00	1,00	—	—
4.	7,50	7,50	7,00	6,00	5,00	3,50	—	—	7,50	7,00	6,00	5,00	4,50	2,50	1,00	—
	6,75	6,50	5,00	4,00	3,50	3,50	—	—	7,50	6,75	6,00	4,25	4,00	2,00	0,50	—
5.	7,00	7,50	5,75	5,00	2,25	—	—	—	7,50	7,50	7,00	5,50	5,00	3,00	1,00	—
	7,00	7,00	5,00	5,00	2,25	—	—	—	6,75	6,75	5,00	4,50	4,00	2,00	0,50	—
6.	7,50	7,00	6,00	4,50	3,50	1,50	—	—	8,50	6,75	6,75	6,25	4,50	—	—	—
	7,50	6,00	4,00	4,00	3,00	1,00	—	—	7,50	6,00	6,00	6,00	4,00	—	—	—
7.	7,50	7,25	6,00	5,00	3,50	—	—	—	7,50	7,50	6,50	3,00	4,00	3,00	1,00	—
	7,50	6,25	5,00	4,50	3,50	—	—	—	7,50	6,50	5,50	3,50	3,50	2,00	1,00	—
8.	7,00	7,00	4,00	4,00	3,00	1,50	—	—	7,50	7,00	6,50	5,50	5,00	2,25	1,00	—
	7,00	6,00	4,00	3,50	2,50	1,00	—	—	7,50	6,50	5,00	4,50	4,00	2,00	0,50	—
9.	7,00	6,00	4,75	3,50	3,25	—	—	—	7,00	6,50	4,75	4,50	4,00	2,00	1,00	—
	7,00	6,00	4,00	3,25	3,25	—	—	—	7,00	6,50	4,25	4,00	4,00	1,50	0,50	—
10.	7,50	7,00	6,00	6,00	4,00	3,00	—	—	7,50	7,50	6,00	6,00	6,00	2,50	—	—
	7,50	6,50	6,00	5,00	4,00	2,50	—	—	7,50	6,50	5,25	5,00	4,00	1,00	—	—

Tabelul 2.
Media și produsul diametrelor suprafețelor dezepitelizate la ochii tratați cu ADN și la ochii martori la iepure — 36 ore după dezepitelizare

Animalu nr.	Media diametrelor			Produsul diametrelor		
	ochiul tratat	ochiul martor	diferența	ochiul tratat	ochiul martor	diferența
1.	2,25	4,50	+ 2,25	5,06	20,00	14,94
2.	4,25	4,62	+ 0,37	17,50	21,00	3,50
3.	4,00	4,00	0	16,00	16,00	0
4.	4,25	4,25	0	17,50	18,00	0,50
5.	2,25	4,50	+ 2,25	5,06	20,00	14,94
6.	3,25	4,25	+ 1,00	10,50	18,00	7,50
7.	3,50	5,50	+ 2,00	12,25	30,00	17,75
8.	2,75	4,50	+ 1,75	7,50	20,00	12,50
9.	3,25	4,00	+ 0,75	10,56	16,00	5,44
10.	4,00	5,00	+ 1,00	16,00	24,00	8,00
Total	33,75	45,12	11,37	17,93	203,25	85,32
Media	3,375	4,512	1,137	1,793	20,325	8,532

În ce privește zona de înaintare a epitelului la ochiul martor, remarcăm bazofilia intensă a celulelor în curs de proliferare, epitelul fiind format la acest nivel din 3—4 rânduri de celule turtite, în comparație cu zona de înaintare a epitelului din corneea ochiului tratat, unde pe lângă bazofilia pronunțată procesul de proliferare pare mult mai activ, celulele epiteliale fiind aranjate în 5—6 rânduri.

Din cele de mai sus reiese că ADN activează procesul de refacere a epitelului corneean lezat, nu numai prin accelerarea migrării celulare, ci și printr-o proliferare mai intensă a celulelor, anundând astfel aceste fenomene fiind evident mai pronunțate la ochii tratați cu ADN decât la cei netratați.

Aceste fapte pledează de asemenea în favoarea afirmației că ADN uman înalt polimerizat, biologic activ, asigură substratul necesar pentru refacerea integrității țesuturilor, în speță a epitelului corneean.

Bibliografie

1. MAZIA D.: Voprosi biofizichi (1957), 136; 2. POP D. POPA DOINA, SĂBĂDEANU V.: Revista Medicală (1965), supliment la Nr. 1.; 3. PREDA V.: Morfologia normală și patologică (1963), 3, 201; 4. STEINBACH M.: Prelucrarea statistică în medicină și biologie. Ed. Acad. R.P.R. (1961), 237; 5. THORELL B.: Chemistry and Biology by R. Chargaff — I. N. Davidson, (1965), 2; 6. WIENER F.: Disertația pentru obținerea titlului de candidat în științele medicale, Tg.-Mureș, 1958.