

UNIVERSITATEA REGELE FERDINAND I. DIN CLUJ
Facultatea de Medicină.

No. 1014.

CERCETĂRI ASUPRA LIPAZEI
ÎN
CRISTALINUL NORMAL ȘI PATOLOGIC



DOCTORAT ÎN MEDICINĂ ȘI CHIRURGIE

PREZENTATĂ ȘI SUSTINUTĂ ÎN ZIUA DE 30 Iunie 1936.

DE

VASILE T. MAGDA

■■■■■■

C L U J

INSTITUTUL DE ARTE GRAFICE „ARDEALUL”
Str. Memorandului 22.

CERCETĂRI ASUPRA LIPAZEI
ÎN
CRISTALINUL NORMAL ȘI PATOLOGIC



DOCTORAT ÎN MEDICINĂ ȘI CHIRURGIE

PREZENTATĂ ȘI SUSTINUTĂ ÎN ZIUA DE 30 Iunie 1936.

DE

VAȘILE T. MAGDA

■■■■■

73 MAY 2005

INST. MED. FARM.
Timișoara
Biblioteca Centrală
Inv. Nr. 89-340

CLUJ

INSTITUTUL DE ARTE GRAFICE „ARDEALUL”
Str. Memorandului 22.

UNIVERSITATEA „REGELE FERDINAND I“ DIN CLUJ
FACULTATEA DE MEDICINĂ

Decan: Domnul Prof. Dr. D. Michail.

Profesorii:

Clinica stomatologică	Prof. Dr	Aleman I.
Istoria medicinei	”	Bologa V.
Bacteriologie	”	Baroni V.
Patologia generală și experimentală	”	Botez A. M.
Clinica oto-rino-laringologică	”	Buzoianu G.
Clinica ginecologică și obstetricală	”	Grigoriu Cr.
Istologia și embriologia umană	”	Drăgoiu I.
Semiologie medicală	”	Goia I.
Clinica medicală	”	Hațieganu I.
Clinica chirurgicală }	”	Pop A.
Medicina operatoare }	”	Pop A.
Medicina legală	”	Kernbach M.
Farmacologia și farmacognozia	Supl.	Popoviciu Gh.
Clinica infantilă	Prof.	Popoviciu Gh.
Clinica oftalmologică	”	Michail D.
” neurologică	”	Minea I.
Igienă și igienă socială	”	Moldovan I.
Radiologia medicală	”	Negru D.
Anatomia descriptivă și topografică	”	Papilian V.
Fiziologia umană	Supl.	Drăgoiu I.
Balneologie	Prof.	Sturza M.
Clinica dermato-venerică	”	Tătaru C.
” urologică	”	Țeposu E.
Chimia biologică	”	Thomas P.
Clinica psihiatrică	”	Urechia C.
Anatomia patologică	”	Vasilii T.

JURIUL DE PROMOȚIUNE

Președinte: Domnul Prof. Dr. D. Michail

Membrii: {	Domnul Prof. Dr. T. Vasiliu
	” ” ” M. Kernbach
	” ” ” V. Bologa
	” ” ” Gh. Popoviciu

Supleant: Domnul Doc. Dr. P. Vancea.

Introducere.

Cataracta senilă este un fenomen minuscul petrecut cu ocazia marilor transformări biochimice, istologice, fiziologice și chiar anatomice ale senilității. Ea reprezintă partea cea mai mare a cataractei așa zise primitive, care mai cuprinde și cataracta juvenilă.

Dor, bazat pe deosebirile în compoziția chimică a cristalinului senil și a cristalinului cataractat afirmă că în cazul cataractei senile e vorba de o boală și nu de o degenerescență senilă.

Oricum ar fi lucrurile, studiul cataractei senile nu poate fi decât un capitol în studiul senilității normale sau patologice.

Ceeace are cataracta senilă propriu este că prin scăderea importantă de vedere, pe care o produce este supărătoare și impresionează. Chiar și în cazurile când ea apare la o vârstă nu prea avansată cu alura unei afecțiuni singurătice, ea de fapt nu face decât să se bucure de situația privilegiată de-a fi cea dintâi remarcată.

Probabil că cu timpul se vor găsi conexiuni de analogie sau chiar de identitate între

cataracta senilă și între leziunile senile ale altor organe sau țesuturi (ficat, rinichiu, țesut nervos, tegument etc.).

Oftalmologul are un atu considerabil în studiul senilității: El scoate cristalinul cataractat cu scopul local de a reda vederea și supunându-l proaspăt la tot felul de cercetări (biochimice, histologice) realizează o adevărată biopsie a senilității. În celelalte ramuri medicale asemenea realizări ori sunt imposibile prin natura și situația viscerului vizat, ori nu sunt justificate de un interes local deosebit.



Biochimia normală a cristalinului.

Cristalinul conține apă, proteine, cholesterină etc.

Proteinele se găsesc în proporția de 34%. Dintre ele s'au separat un albumoid și două globuline (α - și β -cristalina). Albumoidul e o proteină insolubilă și formează un schelet solid țesutului cristalinian. Se găsește în proporția de 17%. α - și β -cristalina sunt proteine solubile. Se găsesc în proporția de 6,8% (α -cristalina) și 11% (β -cristalina).

Cristalinul normal tratat cu nitroprusiat de amoniu dă o colorație roșie: reacția cisteinei. Se crede că de această reacție e responsabilă mai cu seamă β -cristalina.

Se mai găsește în cristalinul normal cholesterină în proporția de 0,30%.

Glucoză, uree nu se găsesc în cristalinul normal.

Biochimia cristalinului cataractat.

În cristalinul cataractat apa crește în proporție, proteinele scad.

Cristalinul cataractat nu mai produce reacția cisteinei probabil, prin transformarea β -cristalinei solubile în albumoid insolubil

(Jess). În cristalinul cataractat e scăzut în cantitate glutathionul redus, deci și activitatea respiratorie, probabil prin scăderea pH-ului: pentru formarea optimă a glutathionului redus e nevoie de un pH=7,5 aproximativ; la pH=6,8 formarea lui e abolită.

Proporția cholesterinei e mărită și în cristalinul cataractat: Michail-Cădariu-Vancea au găsit pe trei cristaline cataractate luate în studiu proporțiile 7,20‰, 7,54‰ și 8,82‰.

Procentele date pentru diferenții componente ai cristalinului normal sau patologic variază după autori însă liniile generale sunt unanim acceptate:

In rezumat:

În cristalinul cataractat se produc modificări foarte accentuate, cari constau din creșterea în proporție a apei, scăderea în proporție a proteinelor, scăderea proteinelor solubile în raport cu albumoidul (reacția cisteinei nu se mai produce), creșterea în proporție a cholesterinei, scăderea pH-ului.

Patogeneza cataractei senile.

E foarte probabil (în lumina paralelei dintre biochimia cristalinului normal și a cristalinului cataractat senil) că formarea cataractei este un proces extrem de complex cu ocazia căruia toți componentii chimici ai cristalinului normal sufăr modificări cantitative și calitative.

În general autorii, cari s'au ocupat cu biochimia cristalinului cataractat sunt dispuși să atribue câte unui singur amănunt biochimic importanța totului. Astfel Dor, impresionat de procentul mărit de apă în cristalinul cataractat, vorbește de o hidratare a țesutului cristalinian. Michail-Vancea pun în centrul chestiunii ipercolesterinia cristalinului cataractat, cu depozitare consecutivă. Thomas expunând compoziția cristalinului cataractat vorbește de transformările proteice, de glutathion, de pH fără măcar să pomenească de cholesterină, de hidratare.

Ideile însă nu se exclud și pot fi puse alăturea.

Dintre ipotezele patogenetice cea mai precis conturată pare a fi ipoteza disfuncției noncreatice cu modificări consecutive în metabolismul lipoidic. Ipoteza pleacă dela o altă ipoteză scoasă din studiul biochimic al cristalinului, că responsabilitatea leziunilor de cataractă o poartă ipercolesterinia locală cu depozitare consecutivă. Ipoteza ipercolesteriniei locale se desinteresează de restul elementelor spre exemplu de proteinele cristalinului, cari atât cantitativ (34%) cât și calitativ (dispariția β -cristalinei și creșterea proporțională a albumoidului) se impun ca niște factori de mare importanță.

Ipercolesterinogeneza în vitro (Michail-Cădariu-Vancea) nu permite nici o concluzie decât că țesutul cristalinian e colesterinogenetic.

Cercetări făcute de Michail-Bendescu pe 12 cazuri de cataractă senilă găsesc metabolismul bazal urcat peste +10% în jumătate din cazuri. Metabolismul bazal era urcat mai ales în cazurile de cataractă nematură.

Ipoteza disfuncției pancreatice își ia importante puncte de sprijin din studiul cataractei naftalinice. Cataracta naftalinică e o cataractă artificială provocată la epure prin administrarea per os (de obicei) ne naftalină. S'a găsit în această cataractă ipercolesterinemie, efect bun asupra evoluției prin insulinoterapie (Michail-Vancea), iperglicemie, ipolipazemie (Michail-Păcurariu). Apoi plecându-se dela aceste fapte s'a studiat colesterinemia la oameni (Michail-Vancea). Rezultatele au corespuns așteptărilor: În aproape totalitatea cazurilor de cataractă senilă s'a găsit o ipercolesterinemie, față de media colesterinemiei senile. Rezultatele acestea au fost puse în legătură cu faptul anterior stabilit al urcării metabolismului bazal în o parte din cazurile de cataractă senilă, amândouă putând fi datorite unei aceleiași cauze.

În rezumat:

Biochimia cristalinului normal și patologic nu e încă precis și complet cunoscută (poate ar prezenta interes studii asupra stării coloidale, a oxidazelor, a pigmentilor ferici).

Ipoteza disfuncției pancreatice este foarte sugestivă și reușește să explice și să lege între ele o seamă de fenomene umane și experimentale la animal.

Rămâne încă de stabilit contribuția posibilă a altor factori nestudiați, cum ar fi: leziuni oculare necristalinene infime posibile, variate modificări umorale, endocrine legate de vârstă.

Cercetări asupra lipazei în cristalinul normal și patologic.

Subiectul tezei de față e inspirat de Dl Prof. Michail și se integrează în spiritul ipotezei disfuncției pancreatice a cataractei senile.

Lucrările au fost executate la Inst. de Fiziologie și au beneficiat de sfatul și de ajutorul fizic direct al D-lui șef de lucrări Gr. Bencato.

Dau mai jos descrierea metodei utilizate și la sfârșit rezultatele.

Metoda.

1. Prepararea extrasului de cristalin.

Extrasul de cristalin l-am preparat după metoda utilizată de Fiessinger și Gajdos pentru studiul puterii lipazice a celulelor dela *Galleria mellonella* în legătură cu rezistența acesteia față de infecția tuberculoasă.

Constă din următoarele (aplicată la cristalin):

Cristalinul extras se spală cu apă distilată pentru a îndepărta urmele de sânge, ser sanguin, umor apos și se usucă atent cu o hârtie de filtru curată. Se face apoi cântărirea la miligram a cristalinului (am utilizat pentru aceasta o balanță de torsione). Se introduce apoi

cristalinul într'un balon mic de sticlă și i se adaugă soluție de glicerină 87% (se dizolvă glicerină pură în apă distilată) în proporția 10 cm³ soluție la 1 gr. de țesut. Se zdrobește apoi și se amestecă intim țesutul cristalinian cu soluția de glicerină cu ajutorul unei baghete de sticlă. E de prisos să mai spun să balonul de sticlă, bagheta, pensa, cu care se apucă cristalinul trebuie să fie sterile (pentru a nu dezvolta ciuperci în timpul păstrării la termostat) și să nu fi fost în contact cu materii organice, cari conțin lipază (sânge, ser sangvin, variate țesuturi). După amestecare balonul cu lichid se pune la termostat pentru 2—3 zile. După trecerea acestor zile se filtrează lichidul tulbur obținut dela termostat și se obține extrasul cristalinian sub forma unui lichid clar.

2. Extrasul obținut se pune în contact cu o soluție saturată de tributirină. Această soluție se prepară punând o picătură de Tributiryn Schering-Kahlbaum sau Merck la 100 cm³ apă distilată și agitând apoi manual timp de 1 oră (pentru a avea siguranța că avem o soluție saturată se poate pune în loc de o picătură de Tributyrin, două sau chiar trei pentru că surplusul se elimină la suprafața lichidului sub forma unor picături de grăsime și natural că dacă pipetăm dela fundul balonului surplusul de grăsime nu e aspirat). Soluția saturată de tributirină trebuie să stea în repaus înainte de utilizare timp de 12—24 ore. După trecerea a 48 ore dela preparare, ea nu mai e utilizabilă. Pentru a favoriza acțiunea lipazei probabile se mai adaugă dintr'o soluție tampon o canti-

tate convenabilă pentru a avea asigurat un pH optim pentru timpul experienței (pH-ul optim pentru lipază este 7,5). Soluția tampon se prepară extemporaneu amestecând $8,2 \text{ cm}^3$ dintr'o soluție $3,56 \text{ gr.} / 200 \text{ cm}^3$ de fosfat disodic cu $1,8 \text{ cm}^3$ dintr'o soluție $2,7232 \text{ gr.} / \text{cm}^3$ de fosfat monopotasic (ambii fosfați sunt special preparați după Sørensen pentru utilizări de laborator). Aceste două soluții se păstrează în băloane de sticlă, cari au adaptate la guri recipiente de sticlă cu Cl^2Ca , care nu permite intrarea CO_2 -ului atmosferic cu ocazia scoaterii de lichid. Lipaza probabilă acționând asupra tributirinei o descompune în glicerină și acid butiric, ori aceștia pe măsură ce se produc atenuiază efectul de scădere a tensiunii superficiale produs de tributirină, așa că rezultatul este o creștere a tensiunii superficiale a lichidului variabilă în timp (progresivă) și măsurabilă.

3. Determinarea tensiunii superficiale a lichidului.

Pentru aceasta am utilizat metoda inelului de platină a lui Lecomte de Noüy.

Iată principiul acestei metode:

Se pune în contact cu suprafața lichidului de examinat un inel de platină (de aproximativ 200 mgr. — corespunzător naturii lichidelor luate în lucru). Apoi se măsoară cu o balanță forța necesară să detașeze inelul de platină de suprafața lichidului (am utilizat în acest scop o balanță de torsiune, care pe lângă avantajul preciziei oferă și pe acela al comodității). În prealabil se face cântărirea inelu-

lui de platină umectat cu apă distilată (pentru a evita greșeala produsă prin lichidul, care rămâne aderent de inel după rupere) și numărul de miligrame obținut se scade din numărul de miligrame obținut la detașarea inelului de suprafață. Restul de miligrame măsoară forța de rupere, care e direct proporțională cu tensiunea superficială a lichidului. Am crezut superfluă calcularea tensiunii superficiale în dine pe cm^2 , pentru că forța de rupere și variația ei în timp permit o înțelegere perfectă a fenomenului. De variația în timp a forței de rupere (și deci a tensiunii superficiale) ne dăm seama măsurând-o la diferite intervale regulate. Dacă notăm pe abscisa unui sistem de coordonate timpul iar pe ordonată valorile în miligrame ale forței de rupere, obținem prin unirea punctelor de intersecție ale perpendicularelor ridicate, o curbă, care ne permite să ne dăm seama de fenomen dintr'o singură privire.

4. Procedura de amănunt.

Se introduce într'o capsulă de sticlă cu ajutorul unei pipete 5 cm^3 din soluția saturată de tributirină.

Se adaugă cu altă pipetă $1,5 \text{ cm}^3$ soluție tampon.

Se introduce apoi cu o a treia pipetă 1 cm^3 de extras glicerinat de cristalin. Se amestecă bine lichidul prin agitare cu ultima pipetă și repetate aspirații, până când se observă că lichidul e omogen și se procedează apoi imediat la măsurarea forței de rupere.

Rezultatele.

Am luat un studiu patru iepuri, cărora le-am făcut întâi determinarea lipazei în cristalinul normal recoltat prin enucleația ochiului drept.

Am obținut valorile de mai jos pentru forța de rupere:

		la 0'	la 15'	la 30'	la 45'	la 60'	
iepurele	I. (Gr. crist. = 389 mgr.)	217	218	217	221	226	mgr.
"	II: (" " = 412 ")	215	213	212	214	214	"
"	III: (" " = 410 ")	207	216	219	223	227	"
"	IV: (" " = 370 ")	225	257	259	261	261	"

Aceiași iepuri îi-am alimentat apoi cu naftalină (sub forma de pastă glicerinață) și apoi le-am făcut în ordinea apariției leziunilor endoculare determinarea lipazei în cristalinul rămas (al ochiului stâng). Notez că leziunile cristaliniene erau ajunse în momentul determinării cel mult până la stadiul de cataractă nematură.

Am obținut valorile de mai jos pentru forța de rupere:

		la 0'	la 15'	la 30'	la 45'	la 60'	
iepurele	I. (Gr. crist. = 439 mgr.)	222	214	216	216	216	
"	IV. (" " = 355 ")	216	215	217	221	226	
"	II. (" " = 327 ")	217	211	211	210	210	
"	III. (" " = 200 ")	217	223	224	225	228	

Am mai făcut determinarea lipazei pe șase cristaline umane cu cataracta senilă matură.

Am obținut valorile de mai jos pentru
forța de rupere:

	la 0'	la 15'	la 30'	la 45'	la 60'
N. F. (60 ani; Gr. crist. = 140 mgr.)	271	266	261	349	247
F. I. (53 " " " = 118 ")	228	225	222	221	221
I. N. (64 " " " = 135 ")	261	224	221	221	221
S. A. (66 " " " = 101 ")	228	222	220	216	214
M. lh. (78 " " " = 87 ")	232	220	214	213	213
M. S. (78 " " " = 103 ")	220	212	210	209	209

Am mai făcut determinarea lipazei pe un
cristalin de iepure atins de cataractă matură
naftalinică datând de aproximativ 3 luni.

Am obținut pentru forța de rupere:

	la 0'	la 15'	la 30'	la 45'	la 60'
Gr. crist. = 461 mgr.	218	213	212	213	213



Concluzii.

1. In cristalinul uman atins de cataractă senilă nu am putut pune în evidență o acțiune lipazică.

2. In cristalinul normal de iepure am pus în evidență o acțiune lipazică în 3 din 4 cazuri.

3. In cristalinul cu leziuni naftalinice dela iepure acțiunea lipazică e scăzută sau chiar dispărută.

4. Se pare că studiul lipazei în cristalin întărește ipoteza disfuncției pancreatice în patogeneza cataractei naftalinice dela iepure și prin analogie a cataractei umane senile.

Văzută și bună de imprimat:

Decanul Facultății:

(ss) Prof. Dr. MICHAIL

Președintele tezei:

(ss) Prof. Dr. MICHAIL

Bibliografie.

Dor L.: Capitolul „Cataractes acquises“ din Encyclopédie française d'Ophthalmologie.

Fiessinger N. et Gajdos A.: Articol din „C. r. des séances de la Soc. de Biol“. Paris (nr. 12 din 1936).

Labbé H. et Lavagna F.: Articol din C. r. hebdomadaire des séances de l'Acad. de Sciences“. Paris (1925).

Marinescu Gh.: Bătrânețe și întinerire. București 1929.

Michaelis L. — Rona P.: Praktikum der physikalischen Chemie insbesondere der Kolloidchemie Berlin 1930.

Michail-Bendescu: Clujul Medical 1926.

Michail-Căăriu-Vancea: Clujul Medical 1925.

Michail-Vancea: Clujul Medical; 1926:

Michail-Vancea: Clujul Medical 1927.

Păcurariu I.: Teză. Cluj 1936.

Thomas P.: Manuel de Biochimie, Paris: 1936:

Zolog N.: Teză, Cluj, 1936.