

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE - SKŁODOWSKA
LUBLIN - POLONIA

VOL. VII, 9.

SECTIO D

1952

Z Kliniki Okulistycznej Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: prof. dr Tadeusz Krwawicz

Tadeusz KRWAWICZ, Maria SEIDLER-DYMITROWSKA,
Andrzej VORBRODT

**Badania nad rozmieszczeniem witaminu C w rogówkach
z wywołanym owrzodzeniem**

**Исследования по размещению витамина С
в роговицах с искусственно вызванной язвой**

**Investigations on the Distribution of Vitamin C
in Corneas with Experimental Ulceration**

Badania Boyda i Campbell'a (1950) wykazały, że gojenie się tkanki kollagenowej jest zależne po części od dostatecznej dostawy kwasu askorbinowego. Zdaniem tych autorów w rogówce, która jest przede wszystkim zbudowana z kollagenu i w której nagromadzają się stosunkowo duże ilości tego kwasu, witamin C może odgrywać doniosłą rolę w metabolizmie tej specjalnej tkanki. W każdym razie stwierdzili oni, że kwas askorbinowy przyspieszał gojenie się głębokich owrzodzeń rogówki.

Campbell, Ferguson i Garry (1950) stwierdzili również, że u świnek morskich głębokie uszkodzenia rogówki goiły się wolniej i trudniej przy braku witaminu C. Zaobserwowali oni również, że witamin C wpływa korzystnie na gojenie się ran głębszych, a nie ma wyraźnego wpływu na gojenie się ubytków nabłonka. Jak z powyższego wynika, wpływ witaminu C na gojenie się owrzodzeń i uszkodzeń rogówki jest godny uwagi. Brak jednak dotąd danych odnośnie rozmieszczenia witaminu C w rogówce dotkniętej owrzodzeniem oraz brak histochemicznych danych określających rolę i wpływ

doprowadzonego do ustroju witaminu C na przebieg gojenia się owrzodzeń rogówki.

W pracy niniejszej postanowiliśmy zająć się tym właśnie zagadnieniem, by uzyskać ewentualne dane, które pozwoliłyby na wykorzystanie dodatniego wpływu witaminu C zastosowanego ogólnie i miejscowo w leczeniu trudno gojących się owrzodzeń rogówki.

Badania własne

a) Metodyka badań

Badania przeprowadzono na 12-tu królikach albinosach.

W pierwszym doświadczeniu badano rozmieszczenie witaminu C w normalnej rogówce u zdrowego kontrolnego królika oraz u królików po podaniu śródżylnie witaminu C (2 ml Cebionu forte) i podspójówkowo (1 ml Cebionu forte) przez okres 4 dni.

U drugiej grupy królików wywoływano owrzodzenia rogówki jednego oka wielkości 4 x 3 mm przez kauteryzację i obserwowano zachowanie odczynu na witamin C normalnie zawartego w rogówce. Dla kontroli badano w każdym przypadku zachowanie się i rozmieszczenie witaminu w drugim zdrowym oku.

U trzeciej grupy królików badano rozmieszczenie witaminu C w rogówkach z wywołanym owrzodzeniem przy doprowadzaniu tego witaminu dożylnie (2 ml Cebionu forte) przez okres 4 dni.

U czwartej grupy królików z wywołanym owrzodzeniem badano rozmieszczenie witaminu C po podspójówkowym doprowadzeniu witaminu C (1 ml Cebionu forte) przez okres 4 dni.

W piątym wreszcie doświadczeniu po wywołaniu owrzodzenia wprowadzano witamin C zarówno podspójówkowo jak i dożylnie, w wyżej podanym okresie czasu i ilościach i obserwowano nasilenie odczynu oraz rozmieszczenie witaminu C.

W każdym przypadku oko drugie zdrowe służyło do badania kontrolnego.

Płaty rogówkowe natychmiast po pobraniu umieszczano w 10% roztworze azotanu srebra z dodatkiem kwasu octowego lodowatego na przeciąg 20 minut w ciemności. Podobnie jak w poprzednich naszych badaniach nad witaminem C w rogówce, do histochemicznego wykazania zredukowanej formy witaminu C wykorzystaliśmy metodę podaną przez Giroud i Leblonda w modyfikacji Romeisa (1943).

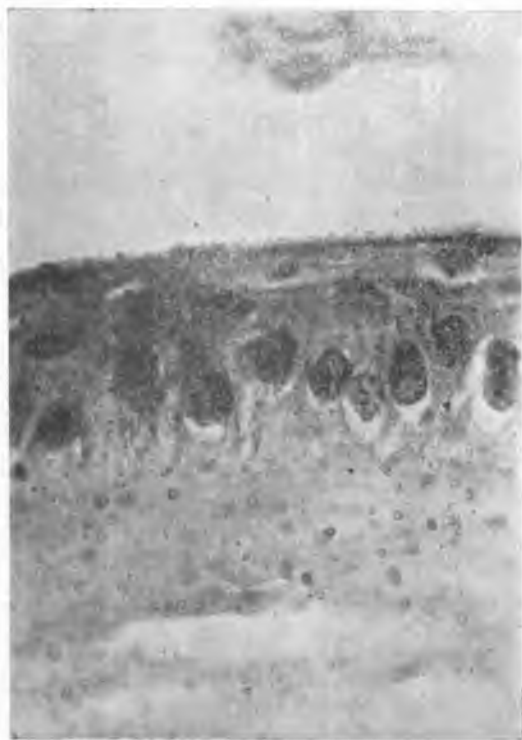
Skrawki grubości 10 mikronów podbarwiano hematoksyliną i eozyną lub błękitem metylenowym. Zredukowana forma witaminu C występowała pod postacią czarnych ziarenek srebra metalicznego.

b) Wyniki badań

W pierwszej serii badań rogówki królików zdrowych, którym podawano witamin C drogą iniekcji śródżylnych i podspojówkowych przez okres 4-ch dni (prep. Nr 1, 2, 6, 7) nie wykazywały bardziej wyraźnych różnic w rozmieszczeniu witaminu C. Odczyn na witamin C w rogówkach u królików, które otrzymywały przez okres 4 dni 2 ml Cebionu forte dożylnie (prep. Nr 6, 7) był gruboziarnisty we wszystkich warstwach komórek nabłonka przedniego rogówki, wyraźny, aczkolwiek nieco słabszy pod nabłonkiem, równomierny i wyraźny w okolicy błony Descemeta. W śródbłonku spotykano jedynie pojedyncze ziarna dodatniego odczynu w niektórych komórkach. Odczyn był zatem nieco wyraźniejszy aniżeli zwykle spotykany w rogówkach u królików normalnych. Zdarzało nam się jednak w poprzednich naszych badaniach obserwować również wyraźne odczyny w rogówkach u królików, które nie otrzymywały witaminu C przed badaniem. Nie ulega wątpliwości, że sposób odżywiania zwierząt mógłby mieć wpływ na wynik badań histochemicznych w kierunku obecności witaminu C. W naszych badaniach w ciągu całego okresu doświadczeń wszystkie króliki były jednakowo odżywiane. U następujących dwu królików, którym podawano witamin C w iniekcjach podspojówkowych (prep. Nr 1, 2) stwierdziliśmy jedynie znaczne nagromadzenie witaminu C w postaci licznych ziarnistości zewnątrzkomórkowych w warstwie właściwej tuż pod nabłonkiem. Poza tym odczyn nie różnił się zasadniczo od odczynu w prawidłowych rogówkach kontrolnych (prep. Nr 1a), który jest uwidoczniiony na rycinie. (Vide Ryc. 1).

U drugiej grupy królików (królik Nr 3, 4, 8, 8a) starano się prześledzić zachowanie się odczynu na witamin C w rogówkach dotkniętych wywołanym owrzodzeniem. W tej serii badań mogliśmy się przekonać, że nieco odmiennie rozmieszcza się witamin C w rogówkach z wywołanym powierzchownym owrzodzeniem (prep. Nr 4 i 8a), aniżeli w rogówkach z głębokimi owrzodzeniami (prep. Nr 3 i 8).

W powierzchownych owrzodzeniach w częściach obwodowych nabłonka brak było odchyień w rozmieszczeniu witaminu C od obrazu



Ryc. 1. Prep. 1. Rogówka normalna. Oko kontrolne (prep. Nr 1a). Widoczny gruboziarnisty odczyn na witamin C w cytoplazmie komórek warstwy podstawowej i warstw środkowych nabłonka przedniego rogówki. Pod nabłonkiem w warstwie właściwej widoczny również odczyn dodatni.

Barwienie: odczyn na witamin C wg Giroud i Leblonda. Jądra podbarwione hematoksyliną. Pow. ca 960 x.

typowego, jaki obserwowaliśmy w oku kontrolnym. Nawet w pobliżu owrzodzenia, tam gdzie nabłonek staje się bardziej spłaszczony, tak że zachowuje się tylko jedna warstwa komórek podstawowych, widoczny jest wyraźny drobnoziarnisty odczyn dodatni. W warstwie właściwej, w częściach jej obwodowych, odczyn zachowuje się podobnie jak w preparacie kontrolnym. W pobliżu owrzodzenia widoczne są ogniskowe skupienia badanego witaminu, lub też odczyn ten ulega znacznemu wzmożeniu w warstwach głębszych i błonie Descemeta, tak że odnosi się wrażenie, iż owrzodzenie jest otoczone strefą dość

bogata w witamin C. Śródbłonek nie wykazywał w tych przypadkach obecności witaminu C.

W głębokich owrzodzeniach rogówki oka doświadczalnego w jej częściach obwodowych, nabłonek wykazywał odczyn na witamin C całkowicie podobny do odczynu w preparacie kontrolnym, lub nieco słabszy. W miarę zbliżania się ku owrzodzeniu daje się zaobserwować zmniejszenie odczynu na witamin C, który wreszcie ulega zanikowi w warstwach średnich i powierzchniowych nabłonka. Przy samym przejściu w owrzodzenie w komórkach warstwy podstawowej również badany odczyn zachowuje się niejednolicie, raz zanika (prep. Nr 3), drugi raz ulega wzmożeniu (prep. Nr 8) występując w postaci czarnych grubych ziarnistości.

W warstwie właściwej, w jej częściach obwodowych odczyn na witamin C osłabiony (prep. Nr 3) lub w częściach powierzchniowych brak go całkowicie (prep. Nr 8). W częściach głębszych warstwy właściwej na obwodzie witamin C wykazuje dość wyraźny odczyn drobnoziarnisty (prep. Nr 8). Przy owrzodzeniu widoczne nacieki drobnokomórkowe, w okolicy których odczyn na witamin C jest bardzo słaby lub negatywny. (Vide Ryc. 2).



Ryc. 2. Prep. Nr 3. Okolice owrzodzenia. W warstwie właściwej widoczny ubytek odczynu na witamin C w najbliższym otoczeniu wrzodu.
Barwienie i pow. jak Ryc. 1.

Pod dnem owrzodzenia i w częściach głębszych (prep. Nr 3, 8) zachowany miernego stopnia drobnoziarnisty odczyn dodatni. Cytoplazma niektórych dużych komórek wędrujących wykazuje drobne ziarnistości, co świadczy o występowaniu w nich zredukowanego witaminu C (prep. Nr 8).

W okolicy błony Descemeta obwodowo utrzymuje się odczyn dodatni. Odczyn ten w okolicy owrzodzenia jest w wielu miejscach wyraźnie osłabiony (prep. Nr 3) lub niekiedy wzmożony (prep. Nr 8).

Śródbłonek nie wykazywał odczynu na witamin C.

W następnym doświadczeniu, w którym stosowaliśmy u królików z wywołanym owrzodzeniem rogówki iniekcje witaminu C podspojówkowe przez okres 4 dni (prep. Nr 9 i 10) daje się zauważyć jakby zmobilizowanie witaminu C w sąsiedztwie wytworzonego owrzodzenia. Miejscami nawet śródbłonek i błona Descemeta pod owrzodzeniem wykazują dodatni odczyn, aczkolwiek nieregularny, gdyż w niektórych miejscach pod owrzodzeniem ulega on w błonie Descemeta zanikowi (prep. Nr 9). W błonie Descemeta i śródbłonku (prep. Nr 10) spotykaliśmy pojedyncze ziarna zredukowanego witaminu C po iniekcji tego witaminu, podczas gdy w preparacie kontrolnym (z drugiego oka) brak było zupełnie witaminu C. W warstwie właściwej w obu preparatach, w pobliżu owrzodzenia, widoczne nasilenie odczynu miejscami tuż pod jego powierzchnią (prep. Nr 10) oraz pod regenerującym nabłonkiem (prep. Nr 11). W częściach obwodowych warstwy właściwej odczyn na ogół o miernym nasileniu. W nabłonku przednim obwodowo, typowe rozmieszczenie witaminu C, podczas gdy w pobliżu owrzodzenia, w warstwach podstawowych, widoczne również ogniskowe zwiększenie odczynu (prep. Nr 10).

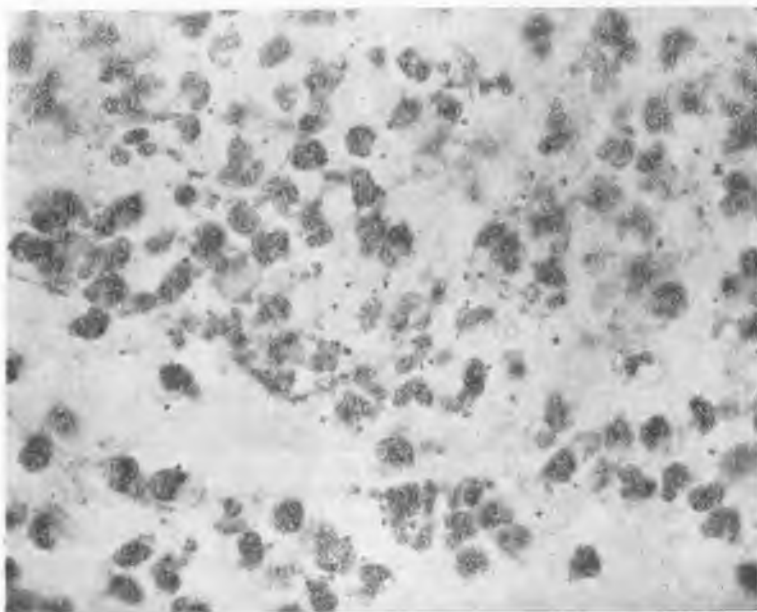
Owrzodzenia goiły się szybciej.

W doświadczeniu, w którym stosowano witamin C dożylnie u królików z owrzodzeniem rogówki jednego oka w ilości 2 ml przez okres 4 dni, zarówno w nabłonku przednim jak i w warstwie właściwej nagromadzenie witaminu C w pobliżu owrzodzenia jest mniej wyraźnie zaznaczone jak w poprzednim doświadczeniu (prep. Nr 11, 12). Odczyn ten jest nieregularny, często ogniskowo zageszczony, tuż pod złuszczonego lub regenerującego nabłonkiem (prep. Nr 11).

Najbardziej wyraźne zmiany w rozmieszczeniu witaminu C w rogówce z wywołanym owrzodzeniem stwierdziliśmy w doświadczeniu, w którym stosowaliśmy witamin C drogą iniekcji podspojówkowych

i dożylnych (królik Nr 5) przez okres 4 dni po 1 ml Cebionu forte podspójkowo i 2 ml dożylnie.

W doświadczeniu tym nabłonek przedni rogówki w częściach obwodowych wykazuje miernego stopnia odczyn na witamin C w postaci nielicznych ziaren wewnątrz cytoplazmy komórek podstawowych oraz w warstwach środkowych i powierzchniowych. W miarę zbliżania się ku owrzodzeniu wzmagają się odczyn w cytoplazmie komórek podstawowych, a zanika w warstwach powierzchniowych i średnich. W warstwie właściwej w jej częściach obwodowych, pod nabłonkiem, oraz w głębszych warstwach odczyn wybitnie zmniejszony lub prawie ujemny. Jedynie w pobliżu błony Descemeta widoczny słaby drobnoziarnisty odczyn. Nie zauważono tutaj dodatniego odczynu wewnątrz stałych komórek rogówki. W pobliżu owrzodzenia daje się zaobserwować naciek drobnokomórkowy oraz komórki o charakterze fibroblastów. Odczyn na witamin C jest tu wzmożony, a w niektórych komórkach widoczne pojedyncze ziarenka rozrzucone w ich cytoplazmie. (Vide Ryc. 3).



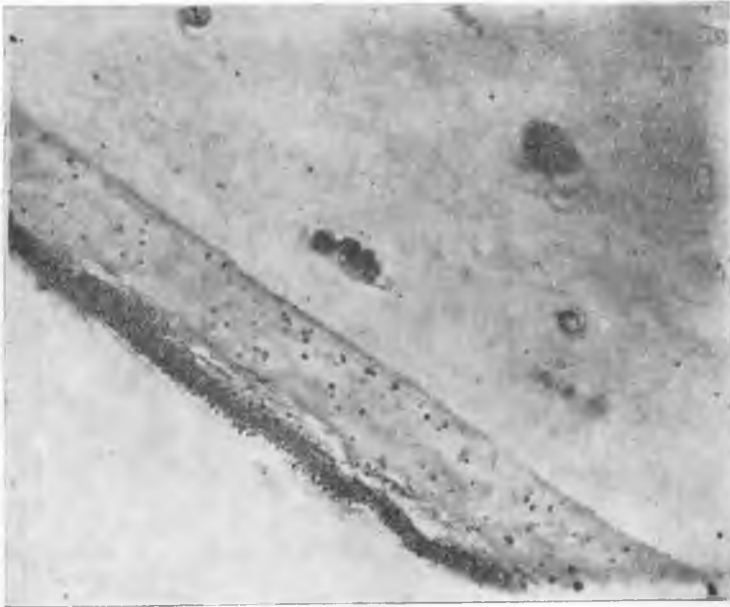
Ryc. 3. Prep. Nr 5. Wśród komórek tworzących naciek w miejscu owrzodzenia widoczne drobne czarne ziarenka srebra wskazujące na zmagazynowanie tutaj witaminu C.

Barwienie i pow. j. w.

Pod owrzodzeniem, tam gdzie warstwa właściwa jest jeszcze zachowana, odczyn na witamin C jest nieco wzmożony i drobnoziarnisty. Dużo witaminu C można zauważyć wśród nagromadzonych tutaj (wywędrowanych) komórek.

Błona Descemeta w częściach obwodowych rogówki wykazuje dość wyraźny drobnoziarnisty odczyn, który w pobliżu owrzodzenia i tuż pod nim staje się mniej regularny tj. miejscami silny, miejscami osłabiony.

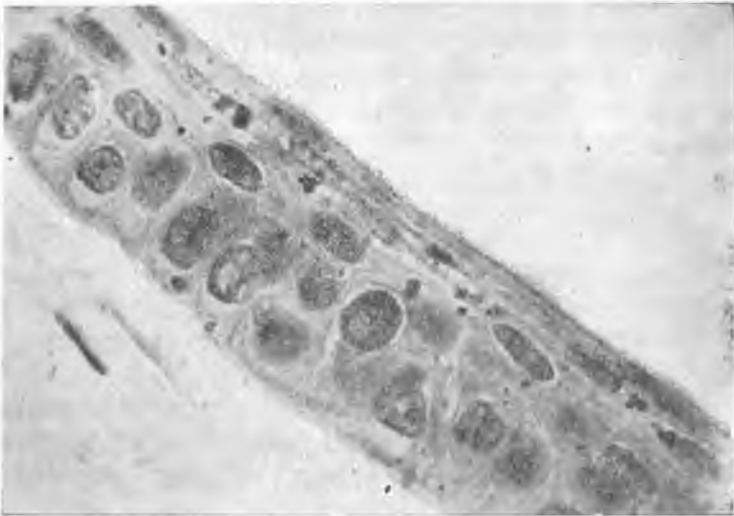
Śródbłonek zarówno w częściach obwodowych rogówki jak i w pobliżu owrzodzenia wykazuje wyjątkowo jak na tę warstwę rogówki silny i dość gruboziarnisty odczyn dodatni, szczególnie od strony komory przedniej. (Vide Ryc. 4).



Ryc. 4. Prep. Nr 5. Królik Nr 5. Inj. Cebionu podspoj. i dożylnie przez okres 4 dni. Wrzód rogówki oka lewego. Odcinek tylnej części rogówki pod owrzodzeniem. Widoczny silny drobno- i gruboziarnisty odczyn dodatni w komórkach śródbłonka oraz na terenie błony Descemeta. W warstwie właściwej odczyn słabszy. Barwienie i pow. j. w.

Pod owrzodzeniem i w niektórych innych miejscach daje się zauważyć zluszczenie komórek śródbłonka.

W oku kontrolnym w nabłonku przednim rogówki odczyn na witamin C widoczny w cytoplazmie komórek podstawowych w postaci nielicznych grubych ziarnistości. W warstwach środkowych i powierzchniowych wiele komórek wykazuje znaczne nagromadzenie witaminu C, uwidoczniającego się grubymi złogami srebra. (Vide Ryc. 5).



Ryc. 5. Prep. Nr 5k. Królik Nr 5. Otrzymał inj. Cebionu przez okres 4 dni dożylnie i podspojówkowo. Oko kontrolne. W komórkach warstw podstawowych środkowych, a szczególnie powierzchniowych, widoczny bardzo gruboziarnisty odczyn dodatni. Grube ziarna zmagazynowane są też zewnątrzkomórkowo. Barwienie i pow. j. w.

W warstwie właściwej na całej przestrzeni widoczny dość wyraźny gruboziarnisty odczyn dodatni zewnątrzkomórkowy. Błona Descemeta również wykazuje wyraźny dodatni drobnoziarnisty odczyn na witamin C.

Omówienie wyników

W wyniku przeprowadzonych badań mogliśmy się przekonać, że odczyn na witamin C w rogówkach u królików, które otrzymywały injekcje Cebionu zarówno podspojówkowo jak i dożylnie, nie wykazywał bardziej wyraźnych różnic w stosunku do obrazu typowego rozmieszczenia tego witaminu w normalnej rogówce. Po podspojówko-

wych iniekcjach witaminu C obserwowano jedynie, znaczne niekiedy, nagromadzenie zredukowanej formy witaminu C w warstwie właściwej tuż pod nabłonkiem.

W rogówce dotkniętej wywołanym powierzchownym owrzodzeniem obserwowaliśmy ogniskowe przesunięcia badanego witaminu zawartego w rogówce w okolicę owrzodzenia, przy głębokich owrzodzeniach natomiast jego ubytek.

W rogówkach królików z wywołanym owrzodzeniem, u których stosowaliśmy iniekcje witaminu C podspojówkowo, dało się zauważyć wyraźne gromadzenie się witaminu C w sąsiedztwie wytworzonego owrzodzenia.

Przy dożylnym wprowadzeniu witaminu C w podobnych warunkach nagromadzenie się jego w pobliżu owrzodzenia było mniej wyraźne.

W wypadku zastosowania witaminu C, zarówno w iniekcjach podspojówkowych jak i dożylnych, wzrasta wyraźnie odczyn na witamin C w pobliżu owrzodzenia, w miejscu nacieku drobnokomórkowego, w cytoplazmie komórek podstawowych nabłonka, pod owrzodzeniem w warstwie właściwej, ogniskowo w błonie Descemeta, oraz w śródbłonku na całej jego przestrzeni.

Z powyżej uzyskanych wyników badań można by sądzić, że witamin C jest jednym z ważnych czynników odgrywających rolę w procesach reparacyjnych tkanki rogówki gromadząc się w pobliżu owrzodzenia, niekiedy jakby je otaczając. Rola tę odgrywa w mniejszym stopniu witamin zawarty w rogówce aniżeli doprowadzony. Słuszne więc wydają się poprzednie spostrzeżenia Boyda i Campbella oraz Campbella i Fergusona, że kwas askorbinowy przyspiesza gojenie się tkanki rogówkowej.

Wartość jednak zastosowania witaminu C dla gojenia się owrzodzeń rogówek u ludzi musiałaby znaleźć swe potwierdzenie w obserwacjach klinicznych.

P I S M I E N N I C T W O

1. Boyd T. A. S., Campbell F. W. — Brit. Med. J. s. 1145—1148, 1950.
2. Campbell F. W., Ferguson I. D., Garry R. C. — Brit. J. Nutrit. Vol. 4/1, s. 32—42, 1950.
3. Giroud A., Leblond C. P. — Bull. d'Histol. Vol. 11, s. 365, 1934.

РЕЗЮМЕ

В результате произведенных гистохимических исследований по размещению витамина С в роговицах кроликов с вызванной язвой, авторами наблюдалось перемещение исследуемого витамина, находящегося нормально в роговице, в случае поверхностных язв в область язвы, при глубоких же язвах его убыток.

В роговицах кроликов с вызванной язвой, у которых применялась инъекция витамина С субконъюнктивально, можно было заметить ясное накапливание витамина С вблизи вызванной язвы. При интравенозных инъекциях витамина С в аналогических условиях, накапливание витамина в соседстве язвы выступало менее ясно.

В случае применения витамина С как субконъюнктивально, так и интравенозно, сильно возрастает реакция на витамин С в соседстве язвы, на месте мелкоклеточного инфильтрата, в цитоплазме основных клеток эпителия, в соответственном слое под язвой, в виде огалов в мембране Десцемета, а также в эндотелии на всем его пространстве.

На основании результатов этих исследований авторы приходят к заключению, что витамин С является одним из важных факторов играющих большую роль в регенеративных процессах роговицы.

S U M M A R Y

Histochemical investigations on the distribution of vitamin C in the cornea of rabbits with experimental ulceration resulted in the following observations:

Vitamin C, normally present in the cornea, was shifted to the region of the ulceration if this was superficial; in deep ulcerations a loss of the vitamin was observed.

In corneas of rabbits with experimental ulceration, vitamin C, when it was injected subconjunctivally, accumulated in the vicinity of the ulceration. When, in similar conditions, it was injected intravenously, its accumulation in the region of the ulceration was less marked.

When vitamin C is administered, both subconjunctivally and intravenously, the reaction to this vitamin markedly increases in the vicinity of the ulceration, in the site of the microcell infiltration, in the cytoplasm of the basal cells of the epithelium, in the stroma under the ulceration, focally in Descemet's membrane, as well as in the whole of the endothelium.

On ground of their investigations the authors arrive at the conclusion that vitamin C is one of the important factors controlling the reparatory processes in the cornea.