

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
“ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ
DOMENIUL DE DOCTORAT: MEDICINĂ VETERINARĂ
SPECIALIZAREA: MORFOLOGIE NORMALĂ ȘI PATOLOGICĂ**

**DOCTORAND,
FLOREA ELENA-CĂTĂLINA**

TEZĂ DE DOCTORAT

MORFOLOGIA GLANDEI HARDER LA IEPURE

**CONDUCĂTOR DOCTORAT,
PROF. UNIV.DR. CORNELIU V. COTEA**

IAȘI- 2011

REZUMAT

La iepure, glanda Harder este un organ mare ce se află în porțiunea antero-medială inferioară a orbitei, în contact direct cu globul ocular, atașată la baza pleoapei a treia. Prezintă doi lobi bine diferențiați (unul roz - ventral și unul alb - dorsal), ce acoperă aproximativ jumătate din suprafața medială a globului ocular, la fața profundă a scheletului cartilagos al membranei nictitante, eliminându-și secreția printr-un canal propriu, în sacul conjunctival, contribuind astfel la producerea fracțiunii lipidice externe a filmului lacrimal.

Conform materialului bibliografic consultat, studii histochimice complexe ale glandei Harder (inclusiv ale produșilor de secreție) și ale membranei nictitante la iepure, insuficient clarificate în literatura de specialitate, pe un număr mare de indivizi, nu au mai fost întreprinse până acum. Studiile cu privire la organogeneza, evaluarea micromorfometrică a principalelor structuri histologice glandulare în perioada dezvoltării postnatale și micromorfometria și statistica unor formațiuni histologice și a produșilor de secreție ai glandei Harder normale la iepurele adult sunt efectuate pentru prima dată, studii similare nefiind identificate în bibliografia autohtonă sau străină consultată. Clarificarea acestor necunoscute reprezintă scopul prezentei teze de doctorat.

Prima parte „*Stadiul cunoașterii*” este constituită din două capitole care sintetizează principalele date bibliografice din literatura de specialitate cu privire la anexele de protecție și de fixare ale globului ocular la iepure (capitolul I) și la membrana nictitantă, axându-se pe informații legate de glanda profundă a acesteia, glanda Harder (capitolul II).

Partea a II-a „*Cercetări proprii*” este constituită din cinci capitole (cap. III – VII). Capitolul III prezintă scopul și obiectivele lucrării, capitolele IV, V și VI prezintă și descriu rezultatele cercetărilor, incluzând materialele și metodele de lucru, discuțiile, interpretările, analiza și concluziile parțiale ce se desprind din cercetările întreprinse. În capitolul VII sunt prezentate concluziile finale, care sintetizează cercetările efectuate. Lucrarea este ilustrată cu un număr de 186 figuri, 10 tabele, 2 grafice și a impus consultarea a 320 titluri bibliografice.

Investigațiile din capitolul IV, cu titlul „*Organogeneza glandei Harder și a membranei nictitante la iepure*” s-au realizat prin prelevarea pieselor histologice de la 67 feteși de iepure de casă, respectiv de la 11 femele: 23 feteși în vârstă de 16 zile (de la trei femele: 6, 8 și respectiv 9 feteși), 13 în vârstă de 20 de zile (de la două femele: 6, respectiv 7 feteși), 9 în vârstă de 24 de zile (de la două femele: 4, respectiv 5 feteși) și 22 în vârstă de 28 de zile (de la patru femele: 5, 5, 6, și respectiv 6 feteși). Dezvoltarea embrionară a fost urmărită și prin examene ecografice, pentru a putea fi luate din timp măsuri corespunzătoare de reîmperechere a femelelor negestante, de protejare a celor gestante, precum și înlăturarea din lot a femelelor sterile. Recoltarea fetușilor s-a realizat prin operații de histerectomie sau histerotomie, în funcție de vârsta gestației.

Din piesele histologice recoltate (la fetușii de 16 și 20 de zile, capul a fost inclus în întregime, iar la fetușii de 24 și 28 de zile, membrana nictitantă împreună cu glanda Harder au fost evidențiate prin secționarea medio-sagitală a craniului, izolând orbita împreună cu conținutul său) s-au realizat secțiuni seriate și s-au obținut preparate histologice permanente prin tehnici de colorare specifice tipului de studiu, astfel: pentru detaliile morfologice, preparatele histologice s-au colorat cu hematoxilină-eosină (HE) și hematoxilină-eosină-albastru de metilen (HEA), iar pentru diferitele aspecte histochimice: acid periodic Schiff (PAS) și Novelli.

Organogeneza membranei nictitante este inițiată la iepure, în cea de-a 16-a zi de gestație sub forma unui pliu mezenchimal acoperit de conjunctivă, la nivelul fundului de sac inferior, acest pliu constituind membrana nictitantă primordială și are lungimea de 87,89 μm.

Pliul conjunctivo-mezenchimal apare alungit și îngustat la fetușii de iepure în vârstă de 20 de zile, iar în grosimea sa proximală se observă debutul histogenezei cartilagineoase sub forma unei aglomerări de celule mezenchimale, ce ia forma unei benzi de-a lungul axului longitudinal al membranei nictitante primordiale.

La fetușii în vârstă de 24 zile, cartilajul membranei nictitante are toate structurile morfologice prezente în cartilajul animalelor adulte, la fetușii în vârstă de 28 de zile, fiind constituit din condrocite situate în condroplaste, complet înconjurate de material matriceal cartilagos, iar periferic este înconjurat de condroblaste și fibroblaste care structurează pericondrul.

Organogeneza glandei profunde a pleoapei a treia, este deja inițiată la fetușii de iepure în vârstă de 20 de zile. La baza viitoarei membrane nictitante, se remarcă existența unei mase celulare cu formă neregulată, structurată din cordoane epiteliale, netunelizate și cu puține ramificații scurte.

La fetușii în vârstă de 24 de zile se evidențiază organizarea glandei Harder la baza cartilajului membranei nictitante prin formarea de cordoane epiteliale primordiale (netunelizate) și canale primordiale (tunelizate), unele prezentând și ramificații, la extremitatea cărora se

diferențiază formațiuni alveolare în procesul de organogeneză. Canalele primordiale (tunelizate) principale prezintă ramificații tubulare secundare, la capătul cărora se formează și se desprind formațiuni alveolare.

Cordoanele celulare și canalele glandulare primordiale, împreună cu formațiunile alveolare primordiale sunt mai numeroase și încep să se asocieze în vederea formării lobulilor glandulari. Formațiunile alveolare primordiale prezintă, spre deosebire de masele celulare acinoase, începutul formării unui lumen central și sunt structurate din unul sau două rânduri de celule epiteliale glandulare, cu aspect cubic, dispuse aproximativ concentric. La feteșii de 28 de zile, dimensiunea acestora nu înregistrează o creștere importantă, dar crește considerabil densitatea lor în cadrul țesutului glandular fetal.

În perioada prenatală, glanda Harder nu manifestă caractere citologice și citochimice în vederea inițierii unei secreții lipidice specifice, putându-se concluziona că este încă o structură imatură la iepurii nou-născuți, urmând ca maturizarea funcțională să se realizeze în cursul perioadei postnatale.

Cercetările descrise în capitolul V, cu titlul „*Dezvoltarea postnatală a glandei Harder și a membranei nictitante la iepure*”, s-au realizat prin prelevarea a 60 glande Harder atașate de membranele nictitante de la 30 de iepuri de casă, câte trei pentru fiecare categorie de vârstă: 1 zi, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28 și 180 zile (adult).

Studiul histologic de urmărire a procesului de dezvoltare a glandei Harder la iepure pe parcursul perioadei postnatale, pentru a se stabili momentul debutului activității secretorii și pentru a observa mecanismul de diferențiere a acesteia, s-a realizat prin efectuarea de preparate histologice permanente din probele recoltate de la iepuri, grupați în 10 categorii de vârstă. S-au utilizat colorațiile HE și HEA, pentru observarea detaliilor morfologice și colorațiile histochemice: PAS (glicoproteine neutre) și contracolorare cu HE și Roșu neutru, în urma post fixării pieselor recoltate în tetraoxid de osmiu, pentru evidențierea produsului lipidic de secreție al celulelor epiteliale glandulare.

Studiul statistic și micromorfometric s-a realizat pe imaginile obținute din preparatele histologice permanente, utilizând microscopul optic *Micros Austria MC300* cu camera video *Moticam 352* atașată. Analiza micromorfometrică a structurilor histologice s-a realizat cu ajutorul *soft-ului Motic Images Plus 2.0 ML*. Au fost măsurate ariile celulelor epiteliale glandulare ale celor doi lobi și nucleii acestora, formațiunile histologice purtând denumirea de variabile în cadrul analizei statistice. S-au efectuat câte 50 de măsurători pe fiecare caz, respectiv 150 de măsurători pentru fiecare variabilă, la fiecare categorie de vârstă. Rezultatele au fost prelucrate statistic cu ajutorul programului statistic *SPSS 17.0*. Cei 30 de iepuri au fost grupați în 10 categorii de vârstă, câte trei în fiecare grupă.

Pentru fiecare variabilă s-au determinat indicatorii statisticii descriptive (media aritmetică, eroarea standard a mediei, intervalul de încredere 95%, deviația standard, valoarea minimă și maximă), pentru fiecare grupă de vârstă, iar pentru descrierea evoluției variabilelor s-au realizat serii cronologice de momente.

La iepurii nou-născuți, glanda Harder are aceeași topografie și mărime raportată la structurile înconjurătoare din orbită ca și la animalele adulte. La examinarea microscopică însă, glanda prezintă caracteristicile morfologice ale unei structuri imature, între formațiunile alveolare fiind prezente din abundență fibre conjunctive, iar cele două tipuri de celule epiteliale glandulare nefiind încă diferențiate.

Este structurată din tubuli secretori ramificați, cu lumen îngust, separați prin fibre conjunctive delicate. Viitoarele celule secretorii au forme variabile, unele fiind cubice, altele prismatice joase, epiteliul glandular apărând uneori stratificat. Un aspect important la această vârstă este reprezentat de raportul nucleu/suprafață celulară, respectiv 1/3.

În cea de-a treia zi după fătare, cea mai importantă caracteristică morfologică a țesutului epitelial este reprezentată de evidențierea în preparatele obținute prin post fixare cu tetraoxid de osmiu, a picăturilor lipidice în citoplasma celulelor epiteliale glandulare ce structurează lobul roz. Prezența lor reprezintă dovada debutului activității secretorii a glandei, chiar dacă aceasta este încă o structură imatură, în celulele glandulare din lobul alb nefiind încă vizibile prin microscopie optică picăturile lipidice.

În ziua a șaptea a dezvoltării neonatale, cei doi lobi ai glandei Harder la iepure pot fi diferențiați macroscopic și caracterizați pe baza culorii lor ca lobul roz și lobul alb. Lobul roz este de aproximativ două ori mai mare decât cel alb, asemenea glandei animalelor adulte.

Se evidențiază schimbări majore în morfologia glandei, raportat la dezvoltarea acesteia observată în prima zi după fătare, remarcându-se o creștere pronunțată a diametrelor alveolare. Cele două tipuri de celule epiteliale glandulare și-au definitivat ultrastructura, devenind vizibile în microscopia optică și picăturile lipidice din citoplasma celulelor epiteliale din lobul alb, colorându-se în gri-gri închis prin post fixare cu tetraoxid de osmiu, datorită conținutului de lipide saturate.

La iepurii în vârstă de 2 săptămâni, dezvoltarea postnatală a glandei Harder pare a fi deplină, modificările ulterioare având loc în principal în interstițiu. Toate celulele secretorii prezintă caracteristici citologice tipice pentru o activitate intensă de secreție a lipidelor.

În lumenul tubulilor secretori pot fi observate uneori aglomerări de picături lipidice, cu aceleași dimensiuni ca ale celor intracitoplasmice. Această imagine este caracteristică lobului roz. În lumenul unor alveole din lobul alb, se evidențiază aglomerări de material pigmentar, care cel mai probabil reprezintă debutul secreției porfirinice.

La iepuri în vârstă de 21 de zile, glanda Harder prezintă caracteristicile morfologice ale acesteia de la animalele adulte. Teritoriul glandular este bine împărțit în lobuli printr-un țesut conjunctiv delicat, ce se desprinde din capsulă, iar vasele sangvine intra- și interlobulare, mai numeroase la nivelul lobului roz, asigură aportul nutrienților celulari.

În plus față de lobii alb și roz, se evidențiază și o porțiune mixtă în zona de delimitare dintre cei doi, pe baza structurii alveolelor glandulare. Caracteristica morfologică a zonei mixte este reprezentată prin prezența în structura aceleiași alveole atât a celulelor epiteliale caracteristice lobului alb (cu picături lipidice intracitoplasmatic mici), cât și a celor caracteristice lobului roz (cu picături lipidice intracitoplasmatic mari). Acest aspect devine vizibil odată cu diferențierea morfologică a celulelor epiteliale din lobul alb, în jur de a șaptea zi a dezvoltării postnatale, în urma apariției picăturilor lipidice intracitoplasmatic cu diametru mic, în celulele epiteliale ale lobului alb.

În cea de-a patra săptămână, glanda Harder prezintă toate caracteristicile morfologice și funcționale ca și cea de la animalele adulte.

Alveolele glandulare din lobul alb sunt constituite din celule epiteliale prismatice cu nucleu sferic, cu suprafața medie de $26,57 \mu\text{m}^2$, situați în treimea inferioară. Raportul nucleu/suprafață celulară este de $1/7$, foarte apropiat de cel de la animalele adulte.

Alveolele glandulare din lobul roz sunt constituite din celule epiteliale prismatice cu nucleu mari, cu suprafața medie de $29,4 \mu\text{m}^2$, situați în treimea inferioară. Raportul nucleu/suprafață celulară este de $1/7$, apropiat de cel de la animalele adulte.

În **lobul alb** *ritmul de creștere a mediilor ariilor celulelor* raportat la prima zi este de 44.16% în cea de-a 2-a zi, în cea de-a 3-a zi este de 58.37%, în cea de-a 5-a zi de 85,09%, în cea de-a 7-a zi de 87.55%, în cea de-a 10-a zi de 108.15%, în cea de-a 14-a zi de 148.22%, în cea de-a 21-a zi de 224.99%, în cea de-a 28-a zi de 275.25%, iar în cea de-a 180-a zi (la adult) de 342.88%.

În **lobul roz** *ritmul de creștere a mediilor ariilor celulelor* raportat la prima zi este de 0.70% în cea de-a 2-a zi, în cea de-a 3-a zi este de 85.46%, în cea de-a 5-a zi de 114.52%, în cea de-a 7-a zi de 118.59%, în cea de-a 10-a zi de 155.68%, în cea de-a 14-a zi de 197.35%, în cea de-a 21-a zi de 281.78%, în cea de-a 28-a zi de 333.60%, iar în cea de-a 180-a zi (la adult) de 537.52%.

Capitolul VI, cu titlul „*Histologia, histochimia, ultrastructura și micromorfometria glandei Harder și a membranei nictitante la iepure*” s-a realizat prin prelevarea glandelor Harder și a membranelor nictitante de la 30 iepuri de casă adulți, proveniți din crescătorii particulare.

Studiul asupra structurii histologice și aspectelor histochimice ale glandei Harder și membranei nictitante la iepurele adult s-a realizat tot prin efectuarea de preparate histologice

permanente din probele recoltate, colorate HE și HEA, pentru observarea detaliilor morfologice și colorații histochimice: PAS (glicoproteine neutre), PAS-albastru Alcian pH 2,5 (glicoproteine neutre și acide), Van Gieson, Masson tricromic, Sudan IV (lipide neutre saturate), Oil Red O (lipide neutre saturate), albastru de Nil (acizi grași, lipide neutre saturate și lipide acide), contracolorare cu HE și roșu neutru, în urma post fixării pieselor recoltate în tetraoxid de osmiu (lipide saturate și nesaturate) și colorate Sudan IV în urma post fixării în bicromat de potasiu (lipide nesaturate), pentru relevarea compoziției chimice a diferitelor structuri histologice ale membranei nictitante și a secreției glandei Harder.

Studiul de microscopie electronică de transmisie s-a realizat pe secțiuni ultrafine de glandă Harder de iepure adult, imaginile fiind obținute utilizând microscopul electronic de transmisie *Tesla BS 500* și *Phillips CM 100*.

Pentru studiul micromorfometric și statistic au fost măsurate ariile alveolelor și tubulilor din ambii lobi, ariile celulelor epiteliale glandulare și ale nucleii acestora din ambii lobi, diametrele picăturilor lipidice și ariile depozitelor porfirinice din ambii lobi. S-au efectuat câte 30 măsurători pentru fiecare variabilă, pe 10 cazuri, respectiv 300 de măsurători pentru fiecare variabilă și s-au determinat indicatorii statisticii descriptive (media aritmetică, eroarea standard a mediei, intervalul de încredere 95%, deviația standard, valoarea minimă și maximă).

La examinarea histologică, membrana nictitantă apare formată dintr-un pliu al conjunctivei, cuprinzând o porțiune ovală de cartilaj. Acesta are formă de farfurioară cu concavitatea mulată pe convexitatea globului ocular și este de tip hialin, restul membranei nictitante fiind constituit din structuri glandulare, țesut adipos și țesut conjunctiv.

Glanda Harder este constituită din unități secretorii tubuloalveolare compuse, care se organizează în lobuli, separați prin septe de țesut conjunctiv, derivate din capsulă. Între alveole și tubuli se pot observa vase de sânge și canale intralobulare. Unitățile tubuloalveolare sunt înconjurate de celule mioepiteliale, iar interstițiul conține plasmocite, limfocite, vase sangvine și canale interlobulare.

Celule epiteliale prismatice ale alveolelor din lobul alb au valoarea medie a ariei de $215,64 \mu\text{m}^2$, cu nucleii sferici, situați în treimea inferioară, ce prezintă nucleoli evidenți, iar citoplasma este vacuolară. Raportul nucleu/suprafață celulară este de 1/8 la iepurii adulți.

Alveolele glandulare din lobul roz sunt constituite din celule epiteliale prismatice cu aria medie de $310,41 \mu\text{m}^2$, cu nucleii situați în treimea inferioară, iar citoplasma este intens vacuolară. Raportul nucleu/suprafață celulară este de 1/9.

Colorațiile histochimice evidențiază prezența celulelor imunocompetente (plasmocite) în țesutul interstițial al glandei Harder, în afară de componente obișnuite, acestea fiind mai

numeroase în lobul alb, decât în cel roz, putându-se concluziona că lobul alb joacă un rol mai important în asigurarea răspunsului imun local.

Reacția pozitivă la ambii coloranți, PAS și albastru Alcian, a cartilajul hialin al membranei nictitante, printr-un amestec de nuanțe magenta-albastru, relevă existența glicoproteinelor neutre și acide în compoziția chimică a acestuia.

Structurile glandulare acinare ce acoperă mare parte din suprafața palpebrală a cartilajului pleoapei a treia sunt de tip mixt (seros și mucos), iar secreția este completată cu cea de tip mixt de la nivelul canalelor excretorii, fapt demonstrat de reacția pozitivă pentru glicoproteine neutre și acide.

Glanda Harder la iepure prezintă o secreție foarte scăzută a ambelor tipuri de glicoproteine la nivelul unităților tubuloalveolare, dar acestea sunt elaborate la nivelul celulelor canalelor excretorii glandulare pentru a fi adăugate secreției lipidice.

Porfirinele sunt evidențiate pe teritoriul ambilor lobi sub forma unor aglomerări intraluminal de material pigmentar, de forme și dimensiuni variate, cu aspect sticlos, prezentând afinitate tinctorială pentru majoritatea coloranților utilizați, ceea ce demonstrează o structură chimică complexă.

Lipidele secretate la nivelurile celulelor epiteliale ale alveolelor și tubulilor glandei Harder la iepure sunt saturate (reacție negativă cromatizare - Sudan IV; tetraoxid de osmiu - slab pozitivă), predominând lipidele neutre (reacție Sudan IV - intens pozitivă, Oil Red O - intens pozitivă, albastru de Nil soluție sulfurică - intens pozitivă), dar fiind prezente și cele acide în mică proporție (albastru de Nil soluție sulfurică - pozitivă).

Studiul de ultrastructură evidențiază joncțiunile de tip desmozomi în pată dintre celule prismatice ale alveolelor glandulare din ambii lobi sunt, la edificarea cărora participă plasmalemele adiacente la distanță de 30-35 nm.

Citoplasma celulelor glandulare conține vezicule cu diametre de 1400-1800 nm în lobul alb și cu diametre mai mari - 4000-5000 nm, în lobul roz, ce prezintă densitate electronică foarte scăzută și sunt delimitate de endomembrane. Contactele strânse între reticulul endoplasmic neted, picăturile lipidice și membrana externă a mitocondriilor, demonstrează cooperarea în vederea realizării proceselor metabolice din celulă pentru o secreție crescută de lipide.

La suprafața internă a endomembranelor produsului de secreție s-a evidențiat un precipitat de culoare închisă, fiind interpretat ca un compus chimic rezultat în urma reacției dintre lipide și tetraoxidul de osmiu.

Analiza micromorfometrică și de statistică descriptivă a principalelor formațiuni morfofuncționale și a principalilor produși de secreție ai ambilor lobi ai glandei Harder la iepurele adult, a condus la stabilirea dimensiunilor normale ale acestor formațiuni și oferă valori

de referință pentru următoare eventuale studii experimentale privind efectul a diferiți factori de mediu sau patogeni asupra morfologiei și activității secretorii a glandei.

Ariile medii ale alveolelor și tubulilor glandulari măsoară $9470,68 \mu\text{m}^2$ în lobul alb și $13735,67 \mu\text{m}^2$ în lobul roz.

Diametrul mediu al picăturilor lipidice este de $1,60 \mu\text{m}$ în celulele epiteliale din lobul alb și de $4,60 \mu\text{m}$ în celulele din lobul roz.

Aria medie a depozitelor de porfirine măsoară $1807,03 \mu\text{m}^2$ în lumenul alveolelor din lobul alb și $3317,66 \mu\text{m}^2$ în lumenul alveolelor din lobul roz.