

REZUMAT

Cuvinte cheie: ficat; celule: stelate, ovale, ”pit”, endoteliale sinusoidale, Kupffer; colangiocite, Paneth, caliciforme; glande ale canalelor biliare; miei (*Ovis aries*), vaci (*Bos taurus*), șoareci (*Mus musculus*).

Obiectivele tezei

Ficatul, alături de alte organe din organismul animal, face parte din categoria organelor vitale fără de care omul sau animalele nu pot supraviețui. Importanța ficatului în menținerea homeostaziei organismului rezidă din multitudinea de funcții pe care le îndeplinește.

Complexul funcțional hepatic este rodul conlucrării tuturor celulelor constitutive iar în stările patologice celulele interrelaționează printr-o cascadă de semnale moleculare în scop protector (antimicrobian), reparator și regenerativ al teritoriilor tisulare afectate.

Ficatul animalelor domestice reprezintă o importantă sursă de proteine pentru om, confiscarea acestuia pe linia de abatorizare duce la pierderi economice importante.

În prezenta cercetare am urmărit reacția tisulară și celulară în unele parazitoze hepatice la miei și la vaci. Un interes deosebit am acordat identificării și confirmării prin colorații speciale a glandelor canalelor biliare și celulelor cu granule oxifile în citoplasmă atașate epitelului canalelor biliare, care au fost observate între colangiocite la ambele specii studiate. Cuantificarea ariei și perimetrului unor hepatocite și a celulelor cu granule oxifile în citoplasmă atașate epitelului canalelor biliare și interpretarea statistică a datelor au reprezentat două dintre obiectivele tezei de doctorat. Un alt obiectiv al studiului din prezenta cercetare a avut drept scop urmărirea reacțiilor celulelor din structura ficatului în infecția experimentală cu virus gripal la șoarece.

Structura tezei – Teza de doctorat ”**Studii privind reactivitatea celulară în hepatopatiile unor mamifere domestice**” este structurată conform prevederilor legale în două părți principale.

Partea I - ”**Studiul bibliografic**”, conține **trei capitole** ce se extind pe 37 pagini, reprezentând 14,86 % din lucrare.

Capitolul I - ”**Aspecte morfologice, structurale și funcționale ale celulelor parenchimatoase din ficat**”. În acest capitol sunt menționate date din literatură legate de caracteristicile morfologice, structurale și funcționale ale hepatocitelor, colangiocitelor și celulelor ovale. S-a făcut o trecere în revistă a metodele de identificare prin colorații speciale și prin imunomarcare, specifice tipului de celulă.

Capitolul II – ”Aspecte morfologice, structurale și funcționale ale celulelor non-parenchimatoase din ficat”

În capitolul al II-lea au fost tratate celulele hepatice non-parenchimatoase, reprezentate de celulele endoteliale sinusoidale, celulele Kupffer, celulele stelate hepatice, celulele NK-rezidente în ficat (”pit”) și celulele dendritice. Pentru acestea, s-au sintetizat și prezentat principalele însușiri morfologice, structurale, funcționale și de interrelaționare ale celulelor. Ca în primul capitol, și aici au fost precizate metodele de colorare și/sau imunomarcare pentru fiecare celulă.

Capitolul III – ”Glandele ductelor biliare”. În acest capitol se face o clasificare a glandelor ductelor biliare în funcție de localizare și de aspectele morfologice, se specifică distribuția lor în raport cu arborele biliar. Se menționează rolul și funcțiile acestora cu trecerea în revistă a câtorva stări patologice care conduc la alterarea structurală și funcțională. De asemenea sunt semnalate tipurile de anticorpi monoclonali utilizați pentru marcarea celulelor glandelor ductelor biliare.

Partea a II-a – ”Cercetări personale” este compusă din **patru capitole** (Capitolele IV-VII) ce au următoarea structură: introducere și scopul cercetărilor, materialul și metodele utilizate, rezultatele obținute, interpretarea acestora și corelații cu datele comunicate în literatură și concluziile generale.

Numărul de pagini al cercetărilor personale este de 212 și reprezintă 85,14 % din teză.

Conținutul tezei cuprinde 263 figuri din care 236 sunt imagini originale iar 27 sunt scheme sau reprezentări grafice. Numărul total de tabele ce se regăsesc în prezenta cercetare este 34.

Scopul cercetărilor a avut mai multe obiective a căror prezentare succintă va fi menționată în descrierea fiecărui capitol.

Materiale și metode

Materialele supuse studiului din prezenta lucrare sunt reprezentate de 108 probe ficat de miel, 66 probe ficat de vacă și 20 probe ficat de șoarece (fiecare preparat histopatologic cu ficat de șoarece conține de la 4 la 8 secțiuni, în total au fost cercetate 109 secțiuni). Examinarea preparatelor histopatologice s-a efectuat cu microscopul optic Olympus BX41 prevăzut cu cameră digitală (Olympus U-TV1X-2) pentru preluarea imaginilor. Capturarea și prelucrarea imaginilor a fost realizată cu ajutorul softului Olympus Cell^B.

Metodele utilizate pentru atingerea obiectivelor și finalizarea cercetărilor au fost:

1. metode de colorare de rutină, utilizate în examenul histopatologic: HE și HEA;
2. metode speciale de colorare: PAS, Albastru Alcian pH 2.5, Albastru Toluidină, Floxină-Tartrazină (capitol VI);
3. Imunomarcare cu anticorpi monoclonali (anti-actina PaB, anti-CD8 și anti-bcl-2) (capitol IV);
4. Analiza morfometrică:
 - numărarea celulelor asociate capilarelor sinusoidale (capitol IV) și a celulelor inflamatorii din spațiile porto-biliare (capitol VII);
 - determinarea ariei și perimetrului hepatocitelor (capitol V) și a celulelor cu granule oxifile în citoplasmă asociate canalelor biliare (capitol VI).
5. Analiza statistică:
 - am utilizat testele: Skewness, Kurtosis, Royston χ^2 , Shapiro-Wilk, Shapiro-Francia W' pentru verificarea normalității și testul neparametric Mann-Whitney U pentru a determina diferențele dintre cele două specii de mamifere domestice (capitolele V și VI);
 - am folosit testele parametrice ANOVA și testul t-Student's (capitolul VII).

Capitolul IV – "Gradul de implicare al spațiului porto-biliar și reacțiile celulare în hepatita de migrație larvară la miei (*Ovis Aries*)"

Principalele obiectivele ale studiului acestui capitol au fost reprezentate de stabilirea gradului de implicare al spațiului porto-biliar în leziunile diagnosticate în parenchimul hepatic și confirmarea sau infirmarea leziunilor identificate, prin examinarea exclusivă a fragmentului de țesut hepatic din loja vezicii biliare. Al doilea obiectiv a fost evaluarea numerică a celulele asociate capilarelor sinusoidale (CACS) și stabilirea unei corelații între numărul de celule asociate capilarelor sinusoidale din imediata vecinătate a zonei lezionate și de la distanță față de leziune. De asemenea, s-a urmărit eventuala asociere a numărului de celule cu stadiul evolutiv al afecțiunii (acută, subacută, cronică) și marcarea variațiilor numerice celulare între loturile cu probe perechi.

Studiile din acest capitol s-au concretizat prin cuantificarea alterărilor structurale din hepatita de migrație larvară a mieilor cu raportarea procentuală a acestora. Modificările anatomopatologice au fost în concordanță cu cele comunicate în literatura de specialitate.

Studiul gradului de implicare al spațiului porto-biliar, în oglindirea cu fidelitate a leziunilor hepatice, a arătat reflectarea cu mare acuratețe a stadiului leziunilor de migrație parazitară (modificări exsudative și de fibrozare) dar și fenomenele specifice reactivității hepatice în caz de distrucții tisulare (hiperplazia canalelor biliare).

Posibilitatea utilizării fragmentului de ficat atașat vezicii biliare (care se confiscă în momentul detașării acesteia pe linia de abatorizare) pentru monitorizarea leziunilor hepatice a fost confirmată prin reflectarea în mare măsură a modificărilor histopatologice care se produc în hepatita parazitară de migrație larvară. Prin rezultatele obținute se susține ipoteza posibilității folosirii ficatului atașat vezicii biliare în scopul supravegherii epidemiologice a animalelor abatorizate, fără a cauza pierderi economice suplimentare.

Reacția celulelor parenchimatoase și a unor celule non-parenchimatoase (Kupffer, stelate hepatice, ”pit” și ovale) din structura ficatului au fost în conformitate cu leziunile traumatice produse de migrația larvară prin ficat.

Prin aplicarea unor metode imunohistochimice pentru marcarea anumitor celule (stelate, ovale și ”pit”) au fost identificate numai celulele stelate hepatice activate. Localizarea acestora a fost la nivelul spațiilor Disse și au prezentat prelungiri citoplasmatic caracteristice, destul de evidente. Numărul redus al acestora a fost în concordanță cu leziunile hepatice în care nu s-au observat fibroza pericelulară sau la nivelul capilarelor sinusoidale. În ceea ce privește celulele ovale și ”pit”, a căror prezență s-a urmărit a fi evidențiată prin imunohistochimie, nu s-au obținut rezultate pozitive în prezentul studiu.

Cuantificarea numărului de celule inflamatorii asociate capilarelor sinusoidale nu a oferit informații remarcabile datorită uniformității de încadrare lezională, predominantă în tipul evolutiv subacut/cronic.

Capitolul V – ”Caracteristici morfologice ale reacției celulare în unele hepatopatii parazitare la vacă (*Bos Taurus*)”

Cercetările din capitolul V s-au concentrat pe stabilirea unui diagnostic lezional, pe evaluarea celor mai importante modificări histopatologice și pe observarea reacției diferitelor celule din ficatul vacilor supuse studiului. Studiul comparativ al modificărilor observate în lobulul hepatic cu cele remarcate în spațiul porto-biliar a constituit un alt obiectiv al cercetării din acest capitol. Al treilea obiectiv este studiul morfometric (aria și perimetrul) al hepatocitelor și găsirea unei corelații între dimensiunile hepatocitelor, starea ponderală a vacilor sacrificate și valorile unor parametri biochimici.

Studiul histopatologic desfășurat pe ficatul de vacă a stabilit că leziunile hepatice au fost produse de trematode, cu localizare la nivelul canalelor biliare, inducând leziuni de colangio-hepatită cronică, dar și de forma larvară a lui *Echinococcus granulosus* care a condus la apariția focarelor de hepatită granulomatoasă. Reacția celulară, reprezentată de implicarea celulelor parenchimatoase (hepatocite, colangiocite), a unor celule non-parenchimatoase (celule Kupffer, celule stelate hepatice) și a celulelor inflamatorii, a fost cuantificată.

Din rezultatele obținute reiese că hepatocitele au fost afectate (cu grade diferite) în toate probele studiate; infiltratul inflamator cu eozinofile a fost găsit în procent mai mare în spațiile porto-biliare decât intralobular iar infiltratul inflamator fără eozinofile a fost mai bine reprezentat intralobular decât porto-biliar. Leziunile mecanice și toxice exercitate de trematode asupra canalelor biliare au determinat necroza și hiperplazia colangiocitelor în toate cazurile, ca răspuns la modificările induse de paraziți.

Un alt parametru care a fost prezent constant în cazurile studiate a fost reprezentat de fibrozarea din spațiile porto-biliare, indusă de activarea celulelor stelate hepatice și a fibrocitelor. Acumularea masivă de țesut conjunctiv în spațiile porte s-a manifestat prin aspecte diferite, cele mai frecvente fiind cele de manșoane în jurul canalelor biliare și în multe cazuri fibrozarea s-a extins cu tendința de formare a pseudolobulilor.

Măsurarea ariilor și perimetrelor hepatocitelor normale/cu modificări morfologice fără implicații patologice și a celor cu distrofie și compararea lor între cele trei loturi formate (în funcție de starea de întreținere) alături de interpretarea statistică a permis observația că între cele două categorii de hepatocite există diferențe semnificative indiferent de starea de întreținere. Comparând aria hepatocitelor normale/cu modificări morfologice fără implicații patologice din cele trei loturi s-a observat că în lotul vacilor cu stare proastă de întreținere acest parametru tinde a fi mai mare decât în celelalte două loturi. Confruntarea valorilor medii a ariei hepatocitelor distrofice arată că diferențele sunt mici, iar din punct de vedere statistic nu sunt diferențe semnificative între loturi. Nu s-au putut face corelații între parametrii biochimici dozați și aria/perimetrul hepatocitelor normale/cu modificări morfologice fără implicații patologice, sau a celor distrofice.

Capitol VI – ”Glandele ductelor biliare și celulele cu granule oxifile asociate epiteliului canalelor biliare la miei și vaci”

Cercetarea din acest capitol s-a axat pe morfologia canalelor biliare, urmărind două obiective principale. Primul a constat în evidențierea și caracterizarea glandelor ductelor biliare din ficatul ovinelor și taurinelor, iar cel de-al doilea țel a fost centrat pe investigarea și caracterizarea celulelor cu granule oxifile în citoplasmă, asociate epiteliului canalelor biliare.

Rezultatele cercetărilor au indicat prezența glandelor unicelulare intraepiteliale (celule caliciforme) la nivelul canalelor biliare de diferite dimensiuni, din ficatul ambelor specii luate în studiu. Confirmarea existenței acestor structuri s-a efectuat prin colorații speciale. În ceea ce privește aspectul morfologic, celulele caliciforme din ficatul mieilor au manifestat aceleași

caracteristici cu cele ale celulelor caliciforme din intestin și din mucoasa respiratorie (formă de cupă), spre deosebire de celele observate în ficatul vacilor, care au prezentat formă columnară.

Glandele ductelor biliare extramurale au fost întâlnite într-un singur caz pentru fiecare specie studiată.

În probele de ficat provenit de la vaci, în care leziunile erau vechi, s-a observat o marcantă hiperplazie a celulelor glandulare intramurale alături de hiperplazia și metaplazia glandulară a canalelor biliare.

Analiza morfometrică a ariei celulelor cu granule oxifile în citoplasmă asociate epitelului canalelor biliare din ficatul mieilor și vacilor precum și analiza statistică indică faptul că la vaci dimensiunile acestora sunt mai mari decât la miei.

Colorațiile speciale și aspectele morfologice ale celulelor cu granule oxifile în citoplasmă, localizate în principal printre colangiocite, au permis emiterea ipotezei că există o heterogenitate celulară și în consecință celulele respective au origini diferite, aparținând mai multor populații celulare. Unele sunt celule Mott și au fost găsite în canalele biliare, în spațiul porto-biliar dar și în unele focare de necroză. Cel de-al doilea tip de celule identificate au fost mastocitele care, de asemenea, au fost văzute la baza epitelului canalelor biliare dar și în spațiul porto-biliar cu fibroză accentuată inserate în țesutul conjunctiv abundent. Pe baza aspectului morfologic și al reacției tinctoriale la colorațiile PAS, Albastru Alcian pH 2,5 și Floxină-Tartrazină lansăm ideea prezenței celui de-al treilea tip de celule ca fiind celule Paneth amplasate exclusiv între colangiocite. În plus, prin colorația Floxină-Tartrazină, au fost evidențiate și mastocitele intra- și extraepiteliale.

Capitolul VII – "Reacțiile celulare și tisulare din ficat în infecția experimentală cu virus gripal la șoarece (*Mus musculus*)"

Obiectivele acestui studiu au fost reprezentate în primul rând de identificarea și cuantificarea modificărilor histopatologice care apar în ficatul șoarecilor infectați experimental cu virus gripal, tulpina H1N1 (PR8 10^{-1} și PR8 10^{-3}), apoi compararea rezultatelor cu datele obținute în lotul martor. Al doilea obiectiv important a constat în evaluarea numerică a celulelor inflamatorii asociate spațiilor porto-biliare și comparația loturilor privind reactivitatea inflamatorie a acestui teritoriu.

Rezultatele cercetării din capitolul VII privind reactivitatea celulelor din structura ficatului la infecția gripală indică apariția modificărilor de tip distrofic la nivelul hepatocitelor. Aceste distrofii (hidroprotidice/steatoză) sunt remarcate inconstant în loturile cărora li s-a administrat virus gripal, fiind în număr mai mare în lotul cu infecție letală. În ceea ce privește

momentul apariției proceselor distrofice, datele obținute în cercetarea noastră sunt în concordanță cu cele din literatura de specialitate, adică declanșarea și instalarea acestora se produce foarte repede după infecția gripală, sunt vizibile în principal în primele zile post-infecție. Un alt tip de reacție al hepatocitelor este remarcat prin prezența necrozelor în ficatul șoarecilor, cele mai multe focare de necroză fiind întâlnite în lotul cu formă ușoară de gripă. Deoarece necrozele au apărut și în lotul martor, se poate interpreta ca fiind produse și de alți factori decât infecția experimentală. Cauza producerii focarelor de necroză hepatică la șoriceii nebulizați cu virus gripal (lotul FGG 10^{-1} și lotul FUG 10^{-3}) este incertă, prezența acestor leziuni neputând fi pusă doar pe seama acțiunii nocive directe sau indirecte a tulpinii folosite în experiment.

Procesul inflamator hepatic este slab exprimat în infecția șoarecilor cu virus gripal (influența virus A PR8/H1N1). Există diferențe numerice și statistice între infiltratul inflamator de la nivel portobiliar atât între lotul FGG 10^{-1} (forma gravă de gripă) și lotul FUG 10^{-3} (forma ușoară de gripă), cât și între lotul FGG 10^{-1} și lotul martor. În lotul cu șoriceii cărora li s-a indus infecția letală (FGG 10^{-1}), numărul mediu de celule inflamatorii/lot este aproape dublu față de lotul martor și destul de mare în comparație cu lotul cu formă ușoară de gripă (FUG 10^{-3}). Diferența numărului mediu de celule inflamatorii de la nivel porto-biliar nu este semnificativă între lotul martor și lotul FUG 10^{-3} , fiind puțin mai mare în lotul cu formă ușoară de gripă.

Bibliografia aferentă tezei de doctorat conține 305 titluri bibliografice din care 11 sunt ale unor autori români iar 294 ale autorilor străini. Din numărul total de surse bibliografice, 241 sunt publicate după anul 2000 iar dintre acestea 135 chiar după 2010 (6 titluri au fost publicate în 2016).