

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

**DOCTORAND,
PETRU CAZACU**

TEZĂ DE DOCTORAT

CERCETĂRI PRIVIND MORFOLOGIA GLANDEI NICTITANTE LA CÂINE

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

IAȘI- 2010

REZUMAT

Glanda nictitantă a câinelui (superficială sau accesorie a pleoapei a treia) este o glandă tubuloacinoasă compusă care elimină produsul de secreție sero-mucos prin exocitoză (merocrinie), contribuind astfel la producerea fracțiunii apoase a filmului lacrimal (90% din volumul lacrimal). Glanda nictitantă este parte structurală a membranei nictitante, iar produsul său de secreție ajunge prin intermediul mai multor canale colectoare la baza sacului conjunctival nictitanto-bulbar.

Glanda nictitantă a câinelui este a doua glandă lacrimală ca importanță, după glanda lacrimală principală, în privința secreției filmului lacrimal, respectiv a fracțiunii apoase a acestuia. Frațiunea apoasă mijlocie a filmului lacrimal are o grosime de 7 μm la câine (fracțiunea lipidică externă – 0,1 μm și fracțiunea mucosă internă – 2 μm), fiind secretată de glanda lacrimală principală în proporție de 61%, glanda nictitantă 35% și glandele accesorii conjunctivale Krause și Wolfring 3%.

Stratul apos mijlociu al filmului lacrimal are rol activ în lubrifierea și protecția suprafeței oculare. Stratul apos mijlociu îndepărtează materialele străine ajunse la nivelul conjunctivei sau corneei și conține factori antibacterieni, imunoglobuline, nutrienți corneeni și factori de creștere cu rol în regenerarea corneei lezate.

Insuficiența secretorie a glandei nictitante, având diferite etiologii, determină lipsa de lubrifiere a corneei cu expunerea sa la agenți agresori biotici sau inerti, imposibilitatea inițierii proceselor de apărare prin insuficiența factorilor antibacterieni și de creștere, având ca rezultat apariția keratoconjunctivitei *sicca*, ce poate duce la pierderea vederii.

Literatura de specialitate privitoare la morfologia glandei nictitante a câinelui se rezumă la descrieri generale anatomice, histologice și histochimice, descrieri histopatologice ale glandei nictitante în prolapsul glandei nictitante, în keratoconjunctivita *sicca* și diverse tumori.

Conform materialului bibliografic consultat, studii histologice și histochimice complexe (acid periodic Schiff, albastru Alcian pH 2,5 și pH 1, PAS-albastru Alcian pH 2,5, orceină-albastru Alcian pH 2,5) ale glandei nictitante (inclusiv ale produsului său de secreție) și ale membranei nictitante la câine, insuficient clarificate în literatura de specialitate autohtonă și

străină, pe un număr mare de indivizi, nu au mai fost întreprinse până acum. Deasemenea, nu au mai fost efectuate până acum nici studii privind organogeneza, histochimia și micromorfometria glandei și a membranei nictitante în dezvoltare la feteșii de câine, studii de autofluorescență histologică, studii de citologie normală în preparate citologice, studii de ultrastructură, precum și studii de micromorfometrie și statistică a formațiunilor histologice ale glandei și membranei nictitante în vederea stabilirii unor relații de cauzalitate sau favorizante între dimensiunile acestor formațiuni și diferite aspecte epidemiologice, clinice și histopatologice ale unor procese morbide ale glandei și membranei nictitante. 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 organogeneza anexelor globului ocular și conformația, structura, vascularizația și inervația organelor anexe ale globului ocular la mamiferele domestice. 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 152 figuri, 75 tabele și a impus consultarea a 209 titluri bibliografice.

Investigațiile capitolului IV, numit „*Organogeneza glandei nictitante și a membranei nictitante la câine*” s-au realizat prin prelevarea membranei nictitante a ambilor ochi de la 39 feteșii de câine, masculi și femele, aparținând unor diferite rase, respectiv de la 6 femele gestante (6 vârste fetale), în urma histerectomiei la cererea proprietarilor: 38 zile (6 feteșii), 42 zile (9 feteșii), 45 zile (5 feteșii), 49 zile (6 feteșii), 53 zile (8 feteșii) și 58 zile (5 feteșii).

Din piesele histologice recoltate s-au realizat secțiuni seriate și s-au executat preparate histologice permanente care au fost colorate cu hematoxilină-eosină (HE) și hematoxilină-eosină-albastru de metilen (HEA) pentru studiul detaliilor morfologice. Pentru diferitele aspecte histochimice, s-au folosit colorațiile: acid periodic Schiff (PAS, cu reactivul Schiff preparat după formula *de Tomasi*) (pentru glicoproteine neutre), PAS-albastru Alcian pH 2,5 (pentru glicoproteine neutre și acide sialilate), albastru Alcian pH 2,5 (pentru glicoproteine acide sialilate), albastru Alcian pH 1 (pentru glicoproteine acide sulfatate) și orceină-albastru Alcian pH 2,5 (pentru glicoproteine acide sulfatate și sialilate).

Inițierea organogenezei glandei nictitante la feteșii canini în vârstă de 38 zile se realizează prin proliferarea epiteliului conjunctival bulbar în mezenchimul subiacent, sub forma unor cordoane epiteliale glandulare din care se desprind mase celulare acinoase. Ulterior,

formațiunile glandulare rezultă prin desprinderea lor de la nivelul invaginărilor și cordoanelor epiteliale sau din canalele primordiale (tunelizate), direcționându-se inițial spre partea bulbară și bazală a cartilajului membranei nictitante (la fetușii în vârstă de 42 zile) și mai târziu pe partea palpebrală (începând cu fetușii de 45 zile).

La fetușii de 45 zile, cartilajul membranei nictitante are toate structurile morfologice prezente în cartilajul hialin al animalelor adulte.

Tot la fetușii în vârstă de 45 zile, debutează și secreția formațiunilor glandulare nictitante (glanda nictitantă primordială), care conține glicoproteine neutre, iar începând cu vârsta fetală de 49 zile și glicoproteine acide sialilate, într-o cantitate mai mică.

Cartilajul membranei nictitante, respectiv materialul matriceal cartilaginos al fetușilor canini cu vârsta cuprinsă între 42 și 58 zile, conține glicoproteine acide sialilate și sulfatate și glicoproteine neutre într-o cantitate mai mică.

Formațiunile glandulare palpebrale se dezvoltă în lungime, de la 122 μm la fetușii în vârstă de 42 zile la 1121,6 μm la cei în vârstă de 58 zile.

Formațiunile glandulare bulbare se dezvoltă în lungime, de la 933,68 μm la fetușii în vârstă de 42 zile la 2540,1 μm la fetușii în vârstă de 58 zile.

Formațiunile glandulare bazale se dezvoltă în lungime, de la 532,2 μm la fetușii în vârstă de 42 zile la 988,71 μm la fetușii în vârstă de 53 zile și 939 μm la fetușii în vârstă de 58 zile.

Cartilajul membranei nictitante prezintă o creștere în lungime o dată cu vârsta fetușilor, de la 2424,9 μm la fetușii în vârstă de 42 zile la 4586,8 μm la fetușii în vârstă de 58 zile, iar grosimea sa variază foarte puțin de la o vârstă la alta în intervalul 93,21-120,2 μm .

Cercetările descrise în capitolul V, numit „*Histologia, histochimia, autofluorescența, citologia și ultrastructura glandei și membranei nictitante la câine*”, s-au realizat prin prelevarea membranei nictitante de la ambii ochi a 82 de câini, din rase diferite, 44 masculi și 38 femele, cu greutatea cuprinsă între 2 – 80 kg și vârsta între 2 luni și 17 ani.

Membranele nictitante au fost fasonate și secționate medio-sagital, executându-se preparate histologice permanente, care au fost apoi colorate în funcție de tipul de studiu, astfel: colorația cu hematoxină-eosină-albastru de metilen (HEA) pentru studiul histologic; cu acid periodic Schiff (PAS, cu reactivul Schiff preparat după formula *de Tomasi*), albastru Alcian pH 2,5, albastru Alcian pH 1, PAS-albastru Alcian pH 2,5 și orceină-albastru Alcian pH 2,5, pentru studiul histochimic; cu hematoxină-eosină (HE), dar s-au folosit și preparate etalate, nedeparafinate și necolorate, pentru studiul fluorescenței naturale. Pentru colorarea preparatelor citologice efectuate prin amprentă sau prin etalarea raclatului din glanda nictitantă, s-au utilizat colorațiile: HE pentru preparate citologice, May-Grunwald-Giemsa (MGG) și acid periodic Schiff-hematoxină (PAS-H). Ulterior, preparatele histologice și citologice au fost examinate la

microscopul optic **MC300 Micros Austria**. Analiza autofluorescenței histologice a glandei nictitante s-a realizat la același microscop, la care s-a atașat un modul de epifluorescență ce operează cu lumină UV, schimbându-se și obiectivele cu cele speciale pentru fluorescență. Preparatele histologice au fost examinate în lumină UV cu lungimea de undă 420-530 nm, utilizându-se filtrele pentru fluorescența verde.

Studiul de microscopie electronică de transmisie s-a realizat la microscopul electronic de transmisie **Philips CM 100**.

Glanda nictitantă este constituită din unități secretorii tubuloacinoase compuse, iar interstițiul este constituit din fibre conjunctive derivate din capsulă (care împart glanda în lobuli glandulari), celule mioepiteliale, plasmocite, limfocite și adipocite intra- și interlobulare.

Conjunctiva nictitantă palpebrală este mai groasă decât cea bulbară, fiind constituită dintr-un epiteliu pavimentos stratificat necheratinizat constituit din 3-5 rânduri de celule epiteliale cubice, rotunde și ovale printre care se găsesc numeroase celule caliciforme.

Conjunctiva nictitantă bulbară din zona proximală până la nivelul limfonodulilor este structurată din punct de vedere histologic dintr-un epiteliu pavimentos stratificat necheratinizat constituit din 2-5 rânduri de celule epiteliale cu formă prismatică, cubică, ovală, rotundă sau aplatizată (aceasta fiind aproximativ și ordinea de dispunere a celulelor epiteliale pe lamina bazală) și este lipsită de celule caliciforme.

Conjunctiva nictitantă bulbară care acoperă limfonodulii – numită și epiteliu asociat limfonodulilor sau limfoepiteliu, are un aspect ondulat în secțiunile histologice medio-sagitale ale membranei nictitante. Pe părțile laterale ale limfonodulului, conjunctiva se reduce la un singur strat de celule cubice, care la nivelul calotei limfonodulului (zona cea mai apropiată de epiteliu) dispare în preparatele histologice din cauza fragilității celulelor epiteliale care-l compun (celule M).

Epiteliul conjunctivei nictitante anterioare și posterioare de la nivelul marginii libere a membranei nictitante este pavimentos stratificat necheratinizat, constituit din stratul generator, 1-3 straturi de celule epiteliale poliedrice și 1-3 straturi de celule superficiale aplatizate.

Conform caracteristicilor structurale, limfonodulii conjunctivei nictitante pot fi considerați țesut limfoid asociat mucoaselor (MALT), mai exact numiți – țesut limfoid asociat conjunctivei nictitante (NCALT – *Nictitating Conjunctiva Associated Lymphoid Tissue*). Astfel, în această teză, limfonodulii conjunctivei nictitante sunt pentru prima dată numiți NCALT. Prin urmare, NCALT, alături de CALT (*Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue*), LGALT (*Lacrimal Gland-Associated Lymphoid Tissue*) și LDALT (*Lacrimal Drainage-Associated Lymphoid Tissue*), fac parte din EALT (*Eye-Associated Lymphoid Tissue*), încadrat la rândul său în MALT (*Mucosal Associated Lymphoid Tissue*).

Din analiza rezultatelor histochimice ale acestui studiu, reiese că glanda nictitantă a câinelui prezintă acini care conțin ambele tipuri de glicoproteine neutre și acide (sialilate și sulfatate). Celulele tubulilor secretori, cu lumen larg, prezintă numai reacție PAS-pozitivă.

La câine, autofluorescența se evidențiază printr-o fluorescență uniformă, difuză, de intensitate scăzută, alteori mai intensă la nivelul polului apical al tuturor sau doar a unor celule epiteliale glandulare.

În preparatele citologice realizate din amprente sau raclate ale glandei nictitante normale, celulele epiteliale glandulare apar în preparatele citologice sub formă de aglomerari de celule epiteliale și/sau de unități secretorii, cu citoplasma acidofilă și cu aspect granular, care înconjoară un nucleu veziculos, dens, de multe ori situat excentric. Celulele epiteliale glandulare au aspect piramidal și polul apical ușor rotunjit, iar unitățile secretorii sunt constituite din 7-10 celule epiteliale glandulare.

Ultrastructural, celulele epiteliale glandulare ale glandei nictitante de câine, prezintă vezicule de secreție de tip seros (cu densitate electronică intensă și uniformă) și de tip mucos (cu densitate electronică scăzută).

Capitolul VI, numit „*Studiu micromorfometric și statistic al glandei și membranei nictitante la câine*”, s-a realizat prin utilizarea preparatelor histologice permanente executate din membrane nictitante de câine, pe secțiuni medio-sagitale, care surprind cel mai bine ansamblul structurilor histologice ale acesteia. S-au folosit preparatele colorate cu hematoxină-eosină-albastru de metilen (HEA) și cu acid periodic Schiff (PAS), microscopul optic **MC300 Micros Austria** cu camera video **Moticam 352** atașată. Analiza micromorfometrică a structurilor histologice și citologice s-a realizat cu ajutorul *soft-ului* **Motic Images Plus 2.0 ML**.

Pentru fiecare câine s-au măsurat principalele formațiuni histologice ale glandei nictitante, porțiunile principale ale glandei și diferite rapoarte stabilite între unele formațiuni histologice ale membranei nictitante. Rezultatele au fost prelucrate statistic cu ajutorul programului statistic **SPSS 10**. Cei 82 de câini au fost grupați, conform sistematizărilor zootehnice și chinologice, în categorii de rase, respectiv: câini de rasă mică (sub 10 kg, 24 câini), câini de rasă mijlocie (10-25 kg, 33 câini) și câini de rasă mare și gigantă (25-90 kg și peste, 25 câini). În cadrul fiecărei categorii de rasă, câinii au fost regrupați pe grupe de vârstă – grupa I (0-2 ani) câini tineri, grupa II (3-8 ani) câini adulți, grupa III (9+ ani) câini seniori. Astfel, la câinii din rasele mici, grupa de vârstă I este formată din 7 câini, grupa de vârstă II – 6 câini, grupa de vârstă III – 11 câini. La câinii din rasele mijlocii, grupa de vârstă I include 18 câini, grupa II – 9 câini și grupa de vârstă III – 6 câini. La câinii din rasele mari, grupa de vârstă I include 9 câini, grupa II – 8 câini și grupa de vârstă III – 8 câini. Apoi, tot în cadrul categoriei de rasă, câinii au fost grupați în funcție de sex: masculi și femele. Astfel, câinii din rasele mici au fost grupați în

13 masculi și 11 femele, câinii din rasele mijlocii au fost grupați în 18 masculi și 15 femele, iar câinii din rasele mari au fost grupați în 13 masculi și 12 femele.

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 și sex din cadrul categoriei de rasă. De asemenea, am verificat dacă există diferențe semnificative statistic între mediile formațiunilor histologice măsurate pentru grupele de vârstă din cadrul categoriei de rasă (mică, mijlocie, mare), prin testul *One-Way ANOVA* și între mediile masculilor și femelelor din cadrul categoriei de rasă, prin testul *Independent-Sample T Test*.

Din studiul efectuat, se observă că dimensiunile limfonodulilor câinilor din rasele mici, din grupa de vârstă 0-2 ani, sunt mai mari ($67245,82 \mu\text{m}^2$ arie/ $374,26 \mu\text{m}$ diametrul mare/ $206,28 \mu\text{m}$ diametrul mic) (diferențe distinct semnificative statistic – $p < 0,010$) față de grupa de vârstă 9+ ani ($37547,61 \mu\text{m}^2$ arie/ $279,06 \mu\text{m}$ diametrul mare/ $155,8 \mu\text{m}$ diametrul mic). Deci, dimensiunile limfonodulilor sunt în mod normal mai mari la câinii tineri (0-2 ani) față de câinii seniori (9+ ani). De asemenea, se observă că grosimea medie a capsulei glandulare bulbare este mai mică ($138 \mu\text{m}$, 0-2 ani și $77,4 \mu\text{m}$, 3-8 ani) decât cea de pe fața palpebrală la câinii din rasele mici, grupele de vârstă 0-2 ($152,13 \mu\text{m}$) și 3-8 ani ($109 \mu\text{m}$), dar diferențele sunt nesemnificative statistic ($p \geq 0,050$), ceea ce ar putea fi o cauză a protrusiei glandei nictitante.

Din studiul efectuat, se observă că dimensiunile limfonodulilor câinilor din rasele mijlocii, nu diferă semnificativ între grupele de vârstă ($p \geq 0,050$), dar aceștia sunt mai mari la câinii în vârstă de 0-2 ani ($125685,3 \mu\text{m}^2$), urmați de câinii în vârstă de 3-8 ani ($115977,2 \mu\text{m}^2$) și cei din grupa de vârstă 9+ ani ($91538,35 \mu\text{m}^2$), deci dimensiunile limfonodulilor sunt în mod normal mai mari la câinii tineri față de câinii adulți și seniori.

S-a observat că grosimea medie a capsulei glandulare bulbare este mai mică ($120,12 \mu\text{m}$, 0-2 ani; $167,3 \mu\text{m}$, 9+ ani) decât cea de pe fața palpebrală la câinii din rasele mijlocii din grupele de vârstă 0-2 ani ($130,41 \mu\text{m}$) și 9+ ani ($202,6 \mu\text{m}$), dar diferența este nesemnificativă statistic ($p \geq 0,050$). Totuși ar putea fi un factor favorizant al protrusiei glandei nictitante pentru câinii tineri din rasele mijlocii.

Dimensiunile mai mari ale limfonodulilor câinilor tineri ($159358,3 \mu\text{m}^2$), grosimea capsulei glandulare bulbare ($121,35 \mu\text{m}$) care este mai subțire decât cea palpebrală ($143,78 \mu\text{m}$), precum și grosimea cartilajului membranei nictitante ($199,44 \mu\text{m}$) care este mai subțire comparativ cu celelalte categorii de vârstă, pot fi considerați factori favorizanți ai protrusiei glandei nictitante la câinii din rasele mari, din grupa de vârstă 0-2 ani.

Cartilajul membranei nictitante este mai subțire la grupa de vârstă 0-2 ani ($199,44 \mu\text{m}$) față de grupa de vârstă 9+ ani ($263,25 \mu\text{m}$) a câinilor de talie mare, putând favoriza eversia

membranei nictitante. La câinii din rasele mari, distanța de la marginea liberă a membranei nictitante la capătul proximal al cartilajului este cea mai mică la grupa de vârstă 0-2 ani (1340,6 μm), urmați de grupele 3-8 (1459,74 μm) și 9+ ani (600,92 μm) (diferențe nesemnificative statistic – $p \geq 0,050$). Această distanță, mai mică la câinii tineri din rasele mari, ar putea favoriza eversia membranei nictitante, spațiul mic făcând adaptarea între conjunctivă și cartilaj mai sensibilă, în cazul unei inegalități de dezvoltare.

La toate rasele de câini (mici, mijlocii, mari) se observă că dimensiunile cele mai mari ale limfonodulilor sunt la grupa de vârstă 0-2 ani (67245,82 μm^2 arie – rasele mici, 125685,3 μm^2 arie – rasele mijlocii, 159358,3 μm^2 arie – rasele mari) și scad în dimensiune odată cu grupa de vârstă (37547,61 μm^2 arie – rasele mici, 91538,35 μm^2 arie – rasele mijlocii, 70862,92 μm^2 arie – rasele mari). Deci, câinii tineri (0-2 ani) au, fiziologic, limfonodulii de dimensiuni mai mari, fapt ce nu trebuie interpretat ca foliculită hiperplazică.

În ceea ce privește numărul limfonodulilor, la câinii din rasele mici și mijlocii numărul acestora crește odată cu vârsta (în secțiunile histologice medio-sagitale ale membranei nictitante), grupa de vârstă 9+ ani având cel mai mare număr de limfonoduli atât la rasele mici (6 limfonoduli) cât și la rasele mijlocii (8,66 limfonoduli), dar diferențele nu prezintă semnificație statistică ($p \geq 0,050$). La câinii din rasele mari numărul cel mai mare de limfonoduli se întâlnește la categoria de vârstă 3-8 ani (7,5 limfonoduli). Prin urmare, câinii din rasele mici și mijlocii, din grupa de vârstă 9+ ani și câinii din rasele mari din grupa de vârstă 3-8 ani, au cel mai mare număr de limfonoduli, ceea ce nu trebuie interpretat ca fiind conjunctivită foliculară.

Țesutul conjunctiv interlobular este mai gros (diferență distinct semnificativă statistic), fiziologic, la femelele câinilor din rasele mici (31,22 μm), comparativ cu masculii (19,02 μm), iar canalele intra- și interlobulare sunt mai mari la câinii din grupa de vârstă 3-8 ani (123,01/78,52 μm – canale intralobulare; 160,25/93,1 μm – canale interlobulare) și la femele (74,25/40,29 μm – canale intralobulare; 142,29/85,75 μm – canale interlobulare) față de masculi (53/41,34 μm – canale intralobulare; 120,82/80,11 μm – canale interlobulare), fără ca diferențele între medii să fie semnificative statistic ($p \geq 0,050$). Deci, dimensiunile mai mari ale acestor structuri histologice la femele și la grupa de vârstă 3-8 ani a câinilor din rasele mici, ar putea favoriza apariția keratoconjunctivitei *sicca*.