



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSONELOR VÂRSTnice
IMPOSDRII



Fondul Social European
POSDRII 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OIPOSDRII



USAMV Iași

REZUMAT

Cuvinte cheie: *prepeliță, Coturnix japonica, morfologie, ovar, oviduct, neurotrofine, imunohistochimie*

Studiile dezvoltării sistemelor biologice s-au extins folosind mereu modele animale, pentru elucidarea aspectelor biochimice și biofizice ale proceselor ontogenetice. Biochimia embrionară caută să surprindă transformările la nivel molecular, care stau la baza dezvoltării și activității organismului embrionar, pentru ca prin aceasta să descopere mecanismele fundamentale ale dezvoltării ontogenetice. Astfel, diferite specii aviare au fost folosite în particular pentru studiul dezvoltării embrionare. În prezent, se utilizează ca model experimental prepelița japoneză.

Extinderea intervențiilor terapeutice pentru prevenirea infertilității atât la femei cât și animalele domestice depinde în mare parte de vârsta reproductivă. Astfel, componentele axului reproductiv joacă un rol în declinul fertilității. În consecință, s-au realizat modele aviare care ar trebui să dovedească eficacitatea mecanismelor naturale împotriva deteriorării procesului reproducător.

Cunoașterea morfologiei aparatului reproducător femel are importanță deosebită în evaluarea pe plan economic a prepeliței, vizând aspecte ale perioadei de incubație, ale sporului de creștere și al procentului de ecloziune. În ultimii ani s-a demonstrat implicarea neurotrofinelor în procesul de reproducție, rolul acestora fiind descris în ovarul și oviductul diferitelor specii de mamifere, însă în prezent nu se cunoaște expresia și rolul acestora în sistemul reproducător la păsări. Scopul acestei teze este de a investiga citochimia ovarului, oviductului și prezența neurotrofinelor în aceste organe la prepeliță urmărind rolul acestora în dezvoltarea și funcționarea sistemului reproducător. Studiul hormonal la această specie a fost corelat cu aspectele morfologice și citochimice ale ovarului și oviductului.

Teza de doctorat intitulată **“Morfologia și citochimia ovarului și oviductului la prepeliță (*Coturnix coturnix japonica*)”** a fost elaborată în cadrul Școlii Doctorale a Facultății

de Medicină Veterinară Iași din cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară “Ion Ionescu de la Brad” din Iași, precum și în cadrul Universității Federico II din Napoli, Italia; pe parcursul celor patru ani de studiu, în perioada 1 octombrie 2010 – 1 octombrie 2014 și este structurată în conformitate cu prevederile legale actuale, în două părți: partea I-a intitulată “*Stadiul actual cunoașterii*”, care cuprinde 44 de pagini și reprezintă 33% și partea a II-a denumită “*Contribuții personale*” este extinsă pe 87 de pagini, reprezentând 67%.

Partea I-a, reprezintă un studiu bibliografic realizat prin consultarea a 255 de titluri și este structurată în trei capitole, în care sunt sintetizate informațiile din literatura de specialitate consultată privind subiectul tezei. În această parte s-au utilizat 20 de figuri pentru a ilustra aspectele studiate și 2 tabele, pentru a detalia informațiile prezentate.

În primul capitol intitulat “*Morfologia aparatului reproducător la prepeliță*” este prezentată prepelița japoneză ca și model în studiile de cercetare. Sunt sintetizate etapele dezvoltării embrionare la prepeliță în raport cu alte specii de păsări. Este prezentată dezvoltarea ovarului și oviductului la prepeliță, evidențiindu-se aspecte histologice, fiind urmată de descrierea macroscopică și microscopică a aparatului genital.

Capitolul al II-lea intitulat “*Neurotrofinele*” descrie filogeneza, profilul biochimic și modul de acțiune al acestora, urmărind activitatea biologică în sistemul reproducător în special.

În capitolul III “*Mecanismele formării oului*” sunt precizate modificările fiziologice în raport cu studiul hormonilor și al neurotrofinelor.

Partea a II-a, “*Contribuții personale*” este constituită din 4 capitole (cap. IV -VII). Capitolul IV prezintă scopul și obiectivele tezei, următoarele capitole (V și VI) prezentând materialele și metodele de lucru, rezultatele cercetărilor, interpretări, discuții și concluzii parțiale. În capitolul VII sunt prezentate concluziile finale, care sintetizează rezultatele obținute.

În capitolul IV, cu titlul “*Scop și obiective*” este redat scopul și principalele obiective ale tezei de doctorat, cu activitățile necesare pentru realizarea acestora. Scopul principal al tezei este descrierea morfologiei ovarului și oviductului la prepelița *Coturnix coturnix japonica*, de la diferențierea sexuală, până la vârful perioadei de ouat a prepelițelor adulte. S-au urmărit aspectele morfologice și citochimice ale dezvoltării aparatului genital la această pasăre specializată pe producția de ouă, pentru a evidenția particularitățile morfo-funcționale. Un alt obiectiv este studiul privind prezența neurotrofinelor în aparatul genital la prepeliță realizat prin examenul imunohistochimic și de imunofluorescență. Prin acest studiu s-a identificat localizarea neurotrofinelor și a receptorilor specifici în structura ovarului și oviductului, urmărindu-se rolul acestora în aparatul reproducător la păsări. Studiul hormonal a fost un alt obiectiv, prin care s-a realizat corelarea cu dezvoltarea aparatului genital la prepeliță.

Cercetările din capitolul V, intitulat „*Microscopia optică a ovarului și oviductului la prepeliță (Coturnix coturnix japonica)*” s-au realizat prin recoltarea probelor de la 230 de cazuri: 122 de embrioni, 46 de prepelițe cu vârste de la o zi până la 44 de zile și 62 de prepelițe adulte. Materialul de studiu a provenit de la biobaza U.Ș.A.M.V. Iași. Au fost realizate imagini macroscopice, iar ouăle și embrionii au fost cântăriți pentru a se evidenția dezvoltarea embrionară. S-au măsurat principalele structuri histologice ale ovarului și oviductului pentru a se evidenția dezvoltarea acestora. În perioada de creștere s-au realizat analize hormonale pentru determinarea estradiolului în sânge. S-au recoltat probe pentru examenul histologic. Probele histologice au fost recoltate diferit, în funcție de dezvoltarea embrionară și colorate HE, HEA, PAS, Novelli și van Giesson. Preparatele histologice au fost examinate la microscopul optic *Motic BI-211A* cu cameră video *Moticam 1000*.

Incubația ouălor de prepeliță se face în condiții asemănătoare cu cele ale găinilor, făcând parte din aceeași clasă, singura diferență fiind perioada de dezvoltare embrionară, de 16-17 zile.

În ziua a 4-a de incubație se identifică zona de dezvoltare a gonadelor și a căilor genitale, care apare în strânsă legătură cu mezonefrosul. Dezvoltarea separată a gonadelor este evidențiată din ziua a 5-a de incubație, putându-se observa chiar diferența de mărime și formă.

Abia din ziua a 7-a până în ziua a 10-a de incubație se manifestă principalele caracteristici ale dezvoltării aparatului genital, ovarul drept regresează alungindu-se în timp ce ovarul stâng se dezvoltă normal, căile genitale atât femele cât și mascul, respectiv Müller și Wolff apar concomitent.

Identificarea gonadei ca ovar s-a făcut prin marcarea zonelor distinctive: medulara și corticala. Corticala este identificată din ziua a 7-a de incubație printr-o îngroșare a epitelului, reprezentând primul criteriu de diferențiere.

Corticala este structura de orientare pentru diferențierea gonadelor sexuale, întrucât aceasta lipsește la testiculul embrionar.

La 9 zile de incubație se remarcă prezența ovogoniilor în corticală, iar creșterea semnificativă a ovocitelor are loc între zilele 9-11 de incubație.

La 13 zile de incubație, foliculii primordiali încep să se formeze, prin dispunerea în jurul ovocitelor a celulelor precursorale ale granuloasei.

Foliculogeneza la prepeliță apare din perioada embrionară, iar la ecloziune ovarul prezintă numeroși foliculi primordiali.

La vârsta de o zi, histologic se remarcă în cadrul ovarului predominanța foliculilor primordiali și rari foliculi primari. Corticala și medulara sunt două zone bine delimitate una de cealaltă la puii de o zi, această delimitare se pierde pe parcursul dezvoltării ovarului.

Oviductul la pui de prepeliță de o zi macroscopic este abia vizibil, iar histologic se distinge doar epiteliu pseudostratificat ciliat.

Dezvoltarea foliculilor are loc prin creșterea în mărime a ovocitului și creșterea numerică a straturilor de celule foliculare.

Pliurile mucoasei oviductului apar în jurul vârstei de două săptămâni, iar segmentele oviductului se diferențiază anatomic la vârsta de 31 de zile. Tot în jurul a 4-5 săptămâni după eclozionare începe formarea glandelor tubulare prin invaginarea epiteliului mucoasei.

Nivelul estradiolului plasmatic crește începând cu 31 de zile după eclozionare.

Dezvoltarea ovarului are loc mai rapid comparativ cu dezvoltarea oviductului, putând influența dezvoltarea acestuia, printr-un control hormonal.

Morfologia ovarului la prepeliță a prezentat asemănări structurale cu ovarul altor specii de păsări: corticala a prezentat numeroși foliculi în diverse stadii de organizare.

Foliculii ovarieni au fost clasificați în primordiali, previtelini, vitelini și atretici. În medulară s-au evidențiat numeroase vase sangvine, filete nervoase și celule interstițiale.

Acest studiu se impune deoarece morfologia și rolul fiziologic al oviductului la păsări este mult mai complex decât la mamifere.

Morfologia oviductului la prepeliță japoneză este similară altor specii de păsări: infundibulul prezintă o mucosă cu pliuri fine, iar distribuția vaselor sangvine nu este uniformă, magnumul este cel mai lung segment al oviductului și la această specie aviară, iar volumul său impresionant este datorat măririi suprafeței secretorii.

Pliurile magnumului, în unele zone, pot acoperi în întregime lumenul oviductului. Aceste pliuri reprezintă totodată principalul criteriu de diferențiere macroscopică a segmentelor din cadrul oviductului.

Pliurile din magnum sunt cele mai înalte comparativ cu celelalte segmente.

Istmul conține glande asemănătoare celor din magnum, însă sunt mai puțin dense și conțin secreție mai redusă.

Mucoasa uterului este pigmentată, iar culoarea roșie-maronie este datorată vaselor sangvine numeroase.

Uterusul și vagina se remarcă histologic prin musculoasă, structură histologică care se dezvoltă în aceste segmente al oviductului. Dezvoltarea musculoasei poate fi în concordanță cu rolurile acestor segmente: de staționare și expulzare a oului, prin contracții.

Cercetările din capitolul VI, intitulat „*Studiul imunohistochimic privind prezența neurotrofinelor și a receptorilor specifici în ovar și oviduct la prepeliță*” au fost realizate pe 49 de embrioni de sex femel și 12 prepelițe adulte *Coturnix coturnix japonica*, de la care s-au

recoltat ovarele. Oviductul s-a recoltat doar de la stadiul de adult. S-au obținut secțiuni de 5-7 μm . O parte din secțiuni au fost folosite pentru examenul imunohistochimic cu marcarea unui singur anticorp, iar o parte au fost folosite pentru examenul de imunofluorescență cu marcarea a doi anticorpi. Pe ovarul adult s-a efectuat și examenul confocal. Tehnica de imunohistochimie cu marcarea unui singur anticorp a fost efectuată cu sistemul Envision. Interpretarea morfologică s-a făcut la microscopul Nikon Eclipse 90i. Imaginile au fost obținute cu software NIS-Elements 4.20.

Pozitivitatea neurotrofinelor și a receptorilor specifici a prezentat diferențe de intensitate în funcție de stadiile foliculilor și segmentele oviductului.

În ovarul adult, prezența neurotrofinelor și a receptorilor specifici a fost asociată cu ovogeneza și foliculogeneza. În ovarul embrionar, prezența neurotrofinelor poate semnifica implicarea acestora în supraviețuirea ovocitelor și totodată un semnal al inițierii formării foliculilor primordiali.

Se poate afirma că niciun factor nu poate acționa independent, existând astfel diferite grade de interacțiune între neurotrofine și factorii intraovarieni în controlul foliculogenezei.

Prezența neurotrofinelor și a receptorilor specifici în sistemul reproductiv sugerează implicarea acestora în funcția oviductului de secreție și transport. Epiteliul a prezentat intensă pozitivitate a celulelor pentru neurotrofine, creându-se o alternare a celulelor pozitive și negative.

Totodată, existența neurotrofinei NGF în glandele tubuloase, care secretă compuși ai oului, sugerează posibilitatea secretării acestora de către glande și ulterior incorporarea în compusul final al oului, în timpul formării acestuia.

Rolul neurotrofinelor în țesutul reproductiv rămâne speculativ, informațiile fiind limitate în ceea ce privește efectul și mecanismul pe parcursul dezvoltării și creșterii foliculare.

Capitolul VII cuprinde concluziile finale care sistematizează rezultatele cercetărilor.