



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OIPOSDRU



UNIVERSITATEA
DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
DIN CRAIOVA

Investește în oameni !

FONDUL SOCIAL EUROPEAN
Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane
2007 – 2013

Axa prioritară 1

**„Educația și formarea profesională în sprijinul creșterii
economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere”**

Domeniul major de intervenție 1.5

„Programe doctorale și postdoctorale în sprijinul cercetării”

Titlul proiectului

***„Creșterea calității și vizibilității rezultatelor cercetării științifice a
doctoranzilor cu frecvență prin acordarea de burse doctorale”***

Contract nr: POSDRU/107/1.5/S/82705

Beneficiar

Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

**PTERIGIONUL - MODEL ANIMAL PENTRU STUDIUL
MODIFICĂRILOR HISTOLOGICE ȘI
IMUNOHISTOCHIMICE**

**CONDUCĂTOR DE DOCTORAT,
Prof. dr. LAURENȚIU MOGOANTĂ**

**STUDENT-DOCTORAND,
Dr. ANDREEA ELENA GOLU**

CRAIOVA - 2013

Cuprins

Introducere.....	4
1 Capitolul I - Dezvoltarea ochiului.....	4
2 Capitolul II – Anatomia și histologia aparatului ocular.....	4
2.1 Segmentul periferic.....	5
2.1.1 Ochiul.....	5
2.1.2 Anexele globului ocular.....	6
2.2 Segmentul intermediar.....	6
2.3 Segmentul central.....	6
3 Capitolul III – Aspecte generale ale pterigionului.....	7
4 Capitolul IV – Studiul clinico-statistic al pterigionului.....	7
5 Capitolul V – Studiul histologic al pterigionului.....	9
6 Capitolul VI – Studiul imunohistochimic al pterigionului.....	9
7 Capitolul VII – Studiul histologic și imunohistochimic al acțiunii radiațiilor ultraviolete asupra polului anterior al globului ocular.....	11
7.1 Material și metodă.....	11
7.2 Rezultate.....	12
8 Capitolul VIII – Concluzii generale.....	12
Bibliografie selectiva.....	14

REZUMAT

Introducere

Pterigionul este o hiperplazie epitelială, caracterizată prin prezența unui țesut fibro-vascular, de formă triunghiulară, ce apare ca urmare a dezvoltării țesutului conjunctiv pe deasupra corneei. În etiopatogenia sa sunt incluse rolul leziunilor produse de radiațiile UV, iritația sau inflamația (Balci Mehmet et al., 2011).

1 Capitolul I - Dezvoltarea ochiului

Dezvoltarea embrionară a segmentului periferic al analizatorului vizual începe încă din stadiile timpurii ale perioadei embrionare. Are ca punct de plecare partea anterioară a tubului neural primitiv, iar dezvoltarea sa este în strânsă legătură cu cea a sistemului nervos central.

Din momentul fecundării, oul uman își începe segmentarea, care durează aproximativ o săptămână. Embrionul se formează în a doua săptămână, iar în săptămâna a 3-a se formează și mezodermul embrionar. Spre sfârșitul săptămânii a 4-a embrionul uman are 40 de somite, este curbat în forma literei C și apar schițele membrilor, arcurile brahiale și organele de simț (Olteanu Mircea, 1989).

2 Capitolul II – Anatomia și histologia aparatului ocular

Aparatul vizual este foarte bine dezvoltat pentru funcția vizuală. Ca orice analizator este alcătuit dintr-un segment periferic (receptor), care primește impulsurile specifice, un segment de conducere (căile nervoase), care conduce impulsul primit de la organul receptor la scoarța cerebrală și un segment central, unde impulsul este transformat în senzație vizuală.

2.1 Segmentul periferic

Aceasta zona este formata din globul ocular și anexele sale.

2.1.1 Ochiul

Ochiul are forma unei sfere cu un conținut fluid, ce este închisă de trei tunici celulare:

- tunica externă, avascularizată, este reprezentată posterior de scleră, un țesut fibros de culoare alb-sidefiu, acoperit de conjunctiva, și este continuat anterior de corneea, o structură transparentă, ce permite radiațiilor luminoase să patrundă în ochi, și prin refracție aceste informații formează imaginea la nivelul retinei. Juncțiunea dintre cele două componente poartă numele de limb sclerocornean

- tunica mijlocie sau uveea are trei componente: irisul, corpul ciliar și coroida și reprezintă componenta vasculară a globului ocular. Irisul este partea cea mai anterioară, colorată, ce intervine în reglarea cantității de lumină absorbită de pupilă. Conține două tipuri de mușchi, cu acțiuni antagonice, ce sunt sub controlul sistemului nervos și controlează forma și diametrul pupilei, important în special în procesul midriază/mioză. Corpul ciliar continuă irisul și are forma unui inel ce încercuiește cristalinul. Are două componente: una musculară, reprezentată de mușchiul ciliar, responsabil de procesul de acomodatie și una vasculară, reprezentată de procesele cilare, care participă la formarea de umoare apoasă, importantă în menținerea presiunii intraoculare. Coroida reprezintă partea posterioară a tunicii mijlocii și este alcătuită dintr-o rețea vasculară ce hrănește retina și este strâns atașată de aceasta.

- tunica internă, reprezentată de retină este componenta nervoasă a ochiului. În alcătuirea sa intră în special celule nervoase ce transmit semnalele vizuale prin intermediul nervului optic la centri nervoși responsabili de formarea imaginii.

Din punct de vedere anatomic, globul ocular prezintă două segmente:

- un segment anterior, alcătuit la rândul său din camera anterioară și camera posterioară. Camera anterioară este delimitată anterior de endoteliul cornean și posterior de iris și fața anterioară a cristalinului, iar camera posterioară este spațiul cuprins între fața posterioară a irisului, corpul ciliar și cristalin. Cele două camere sunt umplute de umoare apoasă și comunică una cu cealaltă la nivelul pupilei.

- un segment posterior, corpul vitros, care este de consistență gelatinoasă, ocupă tot spațiul cuprins între fața posterioară a cristalinului și stratul intern al retinei. Volumul său reprezintă 60% din volumul total al globului ocular și are un rol important în dezvoltarea și menținerea formei acestuia.

2.1.2 Anexele globului ocular

Sunt reprezentate de mușchii extrinseci, pleoapele, conjunctiva și aparatul lacrimal.

2.2 Segmentul intermediar

Este cel care conduce analizatorul vizual și realizează legătura între retină și centrul cortical al vederii, situat în lobul occipital. El este format din nervul optic și radiațiile optice (ale lui Gratiolet).

2.3 Segmentul central

Cunoscut și ca segment cerebral al analizatorului optic este situat în scoarța corticală a lobului occipital, în aria striată (campul 17 Brodman) și în ariile peri și parastriată (ariile 18 și 19 Brodman). Aria 17 primește stimulul luminos brut, aria 18 deosebește obiectele fixe de cele în mișcare, iar aria 19 compară impresiile vizuale cu cele cunoscute anterior (Ignat F., 2000). Pe lângă aceste arii cu rol predominant, mai intervin și cortexul temporal cu rol în recunoașterea obiectelor și cortexul parietal, cu rolul său în recunoașterea simbolurilor (limbaj, vorbit, scris).

La nivelul cortexului, imaginile de la cei doi ochi fuzionează într-o percepție unică, datorită suprapunerii și încrucișării axonilor la nivelul chiasmei optice și

datorită suprapunerii câmpului vizual al celor doi ochi în zona centrală, pe aproximativ 60°.

3 Capitolul III – Aspecte generale ale pterigionului

Pterigionul este considerat a fi o leziune cronică a conjunctivei bulbare, caracterizat prin hiperplazie epitelială și degenerare elastică într-un țesut fibrovascular dens (Dushku N, Reid TW, 1994). În pterigion au fost descrise caracteristici tumor-like ce includ displazie slabă, invazie locală și rată crescută de recurență (Austin P, Jakobiec FA, Iwamoto T., 1983).

Dintre factorii de risc incriminați în etiopatogenia pterigionului, radiațiile ultraviolete sunt acceptate pe scară largă, afecțiune fiind mai frecventă în apropierea ecuatorului și la populația care își desfășoară activitățile zilnice în mediul exterior. Alături de acest factor, au mai fost descrși și infecțiile, factorii genetici, sindromul de ochi uscat, precumși mecanisme moleculare.

4 Capitolul IV – Studiul clinico-statistic al pterigionului

Numărul total de subiecți incluși în studiu a fost de 263 de pacienți, ce au fost internați în Clinica de Oftalmologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova în perioada 1 ianuarie 2008 – 31 decembrie 2012. Diagnosticarea afecțiunii este simplă, datorită prezenței formțiunii triunghiulare, ce este patognomonică.

Pterigionul, cu excepția persoanelor tinere, prezintă o evoluție lentă, cu simptomatologie subiectivă nederanjantă pentru pacient o lungă perioadă de timp. Datorită acestui motiv, vârsta medie de prezentare a pacienților a fost înaintată, atunci când axul vizual a fost deja acoperit și vederea afectată. Extremele întâlnite în studiul nostru în ceea ce privește vârsta au fost de 4 ani în anul 2011, și 99 ani în anul 2010.

Repartiția pacienților privind mediul social de proveniență a scos în evidență o frecvență semnificativ mai mare a pterigionului în rândul persoanelor provenite din mediul rural. Explicația pentru această distribuție este aceea că persoanele din mediul rural își desfășoară activitatea zilnică în mediul exterior. Datorită poziționării în zona de câmpie și existenței unui sol fertil, principala activitate a persoanelor din mediul rural este agricultura.

La persoanele din mediul urban trebuie ținut cont și de faptul că pe lângă UV naturale, oamenii sunt expuși frecvent și la acțiunea UV artificiale, produse de lămpi fluorescente, arcuri voltaice din aparatele de sudură, becuri incandescente cu vapori de mercur, lămpi de ultraviolete utilizate pentru sterilizarea sălilor de chirurgie sau a încăperilor destinate copiilor mici și nou-născuților. Aceste mijloace de expunere ar putea explica tendința de creștere în rândul pacienților din mediul urban.

Unele studii indică o tendință de egalizare a celor două medii, dar la noi diferența continuă să se mențină momentan destul de ridicată.

Distribuția pe sexe evidențiază o frecvență mai mare în rândul femeilor. Datele obținute nu sunt în concordanță cu cele raportate la nivel internațional, unde numărul bărbaților afectați a fost net mai mare (McCarty CA, Fu CL, Taylor HR., 2008; Mackenzie FD, Hirst LW, Battistutta D, Green A., 1992).

Considerăm că această statistică este limitată pentru a putea fi aplicată populației generale, din moment ce cuprinde doar cazurile de pterigion la care s-a intervenit chirurgical. Probabil că rezultatele sunt influențate de procentul mare pe care îl reprezintă populația din mediul rural. Atât femeile, cât și bărbații, prin preocupările lor gospodărești sunt expuși aceluiași factori de mediu potențiali inductori ai pterigionului.

5 Capitolul V – Studiul histologic al pterigionului

Material și metodă. Au fost analizate 132 de fragmente de pterigion, recoltate în urma intervenției chirurgicale de la pacienții internați în Clinica de Oftalmologie a Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova. Fragmentele fixate în formaldehidă 10% au fost trimise la Centrul de Cercetare “Centrul pentru studii de morfologie microscopică și imunologie” al UMF Craiova, unde au fost supuse tehnicii de includere în parafină și apoi prelucrate în vederea obținerii colorațiilor specifice Hematoxilină-Eozină, tricromică Goldner Szeckeli și PAS-Hematoxilină.

Rezultate. Identificarea modificărilor ce au apărut la nivelul epitelului de acoperire al fragmentelor studiate au fost variate, și au depins de orientarea specimenului. Se pare ca vârful pterigionului este acoperit de un epiteliu cornean, în timp ce țesutul ce acoperă cea mai mare parte reprezentată de corp și bază este un epiteliu de tip conjunctival, cu existența unei limite clare între cele două tipuri de țesuturi. Epiteliul de tip conjunctival se caracterizează prin prezența celulelor caliciforme, cu aspect de cupă. Pe alocuri acestea au apărut grupate, îmbrăcând aspect de celule intraepiteliale. Pe alte fragmente studiate, s-a evidențiat existența eroziunilor epiteliale. Stroma fragmentelor a apărut modificată, datorită alterării calității matricei extracelulare. Ea a fost invadată de un număr mare de vase de sânge, în lumenul cărora s-au identificat numeroase eritrocite. Reacția inflamatorie a fost intensă, neuniform distribuită.

6 Capitolul VI – Studiul imunohistochimic al pterigionului

Material și metodă. Imunohistochimia este un procedeu de localizare a proteinelor în celule și țesuturi, utilizând ca principiu capacitatea anticorpilor de a se lega de antigeni specifici în țesuturi. Aceasta reacție antigen-anticorp este

marcată cu un cromogen făcând posibilă vizualizarea ei prin microscopie optică. Imunohistochimia reprezintă o posibilitate de a completa diagnosticul histopatologic dar nu reprezintă un diagnostic ”în sine”. Din totalul de fragmente de pterigion recoltate, doar pe un număr de 37 a putut fi făcut examenul imunohistochimic.

Rezultate. Modificările studiul imunohistochimic au evidențiat la nivelul stromei prezența răspunsului inflamator și apariția rețelei vasculare și limfatice.

Pentru identificarea celulelor infiltratului inflamator, am recurs la utilizarea unor anticorpi specifici:

- CD3 pentru limfocitele T;
- CD20 pentru limfocitele B;
- CD68 pentru macrofage.

Prezența limfocitelor și plasmocitelor în stroma fragmentelor de pterigion a susținut implicarea proceselor imunologice în patogeneza afecțiunii. Este sugerat faptul că dezvoltarea pterigionului implică existența unei reacții inflamatorii cronice.

Antigenul CD68 este unul dintre cei mai reactivi markeri imunohistochimici ai macrofagelor la nivel tisular.

Polverini et al. a descoperit faptul că macrofagele activate și mediile lor corespondente de cultură sunt capabile să inducă neovascularizație pe corneele analizate, în timp ce macrofagele peritoneale nestimulate nu prezintă această caracteristică (Polverini PJ, 1977).

Pentru evidențierea vaselor sanguine și limfatice am recurs la imunocolorarea cu anticorpii anti-CD34 și anti-D2-40.

Procesul de angiogeneză este foarte bine reprezentat la nivelul stromei pterigionului, indiferent de modificările observate la nivelul epitelului. El presupune formarea de noi vase de sânge din structuri vasculare preexistente.

Mecanismul angiogenezei este menținut în limite normale de funcționare datorită echilibrului dintre factorii angiogenici și angiostatici. Neovascularizația poate fi precedată de o importantă reacție inflamatorie persistentă.

Originea vaselor de sânge din structura pterigionului este în vasele conjunctivei bulbare, iar celulele stem pentru dezvoltarea pterigionului se pare că sunt localizate la nivelul limbului sclero-cornean. Vasele de sânge apărute pe speciemenle studiate au fost difuz distribuite la nivelul stromei, nepărând să fie influențate de diverși factori locali.

Unele studii care au analizat imunocolorarea CD34 în pterigion au evidențiat o frecvență mai mare a acestor celule la nivelul vârfului pterionului, zonă ce prezintă proprietăți proliferative intense, și în pterigioanele recurente. Aceste evidențe întăresc implicarea celulelor stem în patogeneza pterigioanelor și a recurențelor după îndepărtarea chirurgicală.

Pe preparatele noastre, imunoclorarea D2-40 a evidențiat prezența vaselor limfatice la nivelul stromei, în imediata apropiere de stratul epitelial. Aceste vase au fost tortuoase, cu lumenul mare. În prezent sunt puține lucruri știute despre importanța limfangiogenezei în pterigion, din moment ce un număr limitat de studii a urmărit acest subiect. Numărul crescut de vase limfatice întâlnit în pterigion poate fi datorat mecanismelor de reducere a edemului, apărut ca urmare a iritației cornice.

7 Capitolul VII – Studiul histologic și imunohistochimic al acțiunii radiațiilor ultraviolete asupra polului anterior al globului ocular

7.1 Material și metodă

Pentru studiu au fost selectați 20 de șobolani tineri rasa Wistar comun. Sursa de iradiere a fost reprezentată de o lampă specială ce a emis de radiații în spectrul

UV. Expunerea a fost făcută timp de 5 zile consecutiv, de la aceeași distanță și doar la nivelul ochiului stâng, ochiul drept fiind protejat și utilizat ca martor. Șobolanii su fost sacrificați la o săptămână de la ultima zi de expunere și au fost recoltați de la toți șobolanii atât ochiul stâng (iradiat) cât și cel drept (neiradiat), care au fost imediat trecuți în soluție fixatoare de formol neutru 10% timp de 3 zile și apoi incluși în parafină.

7.2 Rezultate

Prima etapă a studiului experimental a urmărit obținerea unor colorații histologice uzuale, pentru studierea modificărilor apărute ca urmare a expunerii polului anterior al ochilor de șobolan la radiații ultraviolete. În acest scop, am apelat la colorațiile cu Hematoxină-Eozină și tricromicul cu verde de lumină – Goldner Szeckeli. Modificările identificate pe lamele studiate au fost la nivelul epitelului și porțiunii anterioare a stromei, în timp ce endoteliul a fost intact. Modificările observate sunt în concordanță cu descrierile din literatură care suțin că epitelul, fiind structura superficială a corneei are un coeficient de absorbție mai mare, intervenind în protecția structurilor subiacente. Efectele radiațiilor ultraviolete asupra corneei depind de lungimea de undă, cât și de suma radiațiilor absorbite de țesut.

Examenul imunohistochimic efectuat în acest capitol a urmărit, la fel ca și cel aplicat fragmentelor de pterigion uman reacția inflamatorie și angiogenică, posibile prin utilizarea markerilor CD34 pentru vasele de sânge și CD68 și CD168 pentru reacția inflamatorie.

8 Capitolul VIII – Concluzii generale

1. Analizând repartiția pe sexe, se constată o frecvență mai mare în rândul femeilor, în mod contrar majorității statisticilor internaționale, dar în acest caz,

raportul ar putea suferi unele modificări dacă s-ar putea face o statistică privind toți pacienții diagnosticați și nu doar a celor internați în Clinica de Oftalmologie pentru aplicarea tratamentului chirurgical.

2. După mediul de proveniență al pacienților, am observat o aglomerare în mediul rural, și chiar dacă în ultimii ani tendința a fost de creștere și în mediul urban, nu se poate aștepta la o uniformizare a repartiției în viitorul apropiat.

3. Ca vârstă, pterigionul apare încă din adolescență, dar datorită lipsei unei simptomatologii supărătoare, afecțiunea este cel mai frecvent tratată la vârsta adultă, în stadii avansate, când au apărut modificările de vedere datorate astigmatismului indus sau acoperirii axului vizual de către pterigion.

4. Analiza histologică a fragmentelor de pterigion a evidențiat existența modificărilor epitelului de acoperire în funcție de orientarea fragmentului. Vârful pterigionului a fost acoperit de un epiteliu de tip corneean, cu celule ce au avut tendința la keratinizare, în timp ce corpul a prezentat un epiteliu conjunctival, cu celule caliciforme în profunzimea lui.

5. Modificările apărute la nivelul epitelului au fost variate chiar în cadrul aceluiași fragment, putând evolua de la o hiperplazie minoră la displazii de grade diferite și chiar carcinom în situ, cu tendință la invazie în structurile profunde.

6. În unele situații s-au observat înfundări ale stratului epitelial în cel conjunctival subiacent, format în principal din celule caliciforme grupate sub forma unor glande intraepiteliale, precum și numeroase eroziuni, cu reacție inflamatorie bogată pe aceste fragmente.

7. La nivelul stromei au fost identificate cele mai importante modificări – o rețea vasculară complexă, formată din arteriole, capilare și venule, edem și celule aparținând sistemului imun limfo-plasmocitar, și macrofage.

8. Examenul imunohistochimic a evidențiat o reacție inflamatorie în general săracă, macrofagele au fost puse în evidență cu ajutorul anticorpului CD68 care,

deși rare, au apărut sub formă de aglomerări pe fragmentele de pterigion ce au prezentat eroziuni ale epitelului, sau în jurul vaselor de sânge nou formate.

9. Imunomarcajul CD34 a fost folosit pentru identificarea structurilor angiogenice. El a fost pozitiv în celulele de la nivelul endoteliului vascular, dar s-a observat și imediat subepitelial, prezența sa pledează pentru implicarea celulelor stem de la nivelul limbului în etiopatogenia afecțiunii.

10. Pe nivelul fragmentelor studiate s-au identificat vase limfatice de calibru mare, imunomarcate D2-40, ceea ce întărește implicarea mecanismelor imunologice în etiopatogenia pterigionului.

11. Radiațiile ultraviolete acționează doar asupra structurilor anterioare ale corneei, epiteliul și stroma prezentând secundar variate modificări, spre deosebire de endoteliul, care a rămas intact.

12. Angiogeneza a fost bine reprezentată pe fragmentele de cornee iradiată, sistemul vascular apărut a fost unul complex, format din arteriole, capilare și venule.

13. Sistemul imun a fost intens activat, fapt exprimat în special prin prezența monocitelor și macrofagelor.

Bibliografie selectiva

- 1. Austin P, Jakobiec FA, Iwamoto T.** - Elastodysplasia and elastodystrophy as the pathologic bases of ocular pterygia and pinguecula. *Ophthalmology* 1983; 90: 96–109
- 2. Balci Mehmet, Şahin Şemsettin, Mutlu Mehmet Mutlu, Yağci Ramazan, Karanci Pinar, Yildiz Metin** - Investigation of oxidative stress in pterygium tissue, *Molecular Vision* 2011; 17:443-447.

3. **Dushku N, Reid TW** - Immunohistochemical evidence that human pterygia originate from the invasion of vimentin-expressing altered limbal epithelial basal cells. *Curr Eye Res* 1994, 13:473–481.
4. **Ignat Florica** - *Oftalmologia clinica (curs pentru studenti)*, Ed. Reprograph, Craiova, 2000.
5. **Mackenzie FD, Hirst LW, Battistutta D, Green A** - Risk analysis in the development of pterygia. *Ophthalmology* 1992, 99: 1056–1061.
6. **McCarty CA, Fu CL, Taylor HR** - Epidemiology of pterygium în Victoria, Australia. *Br J Ophthalmo* 2000; 84: 289–292.
7. **Olteanu Mircea** - *Tratat de Oftalmologie (vol. I)* Editura Medicala, 1989.