
REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Evaluarea morfofuncțională a celulelor producătoare de mucină în inflamația intestinală acută

Doctorand **Ilinca Iozon**

Conducător de doctorat **Prof. univ. dr. Laura Cristina Ștefănuț**



INTRODUCERE

Tractul gastrointestinal al mamiferelor este un sistem complex în care interacțiunea diferitelor tipuri de celule și molecule joacă un rol crucial în menținerea homeostaziei intestinale. Dintre aceste tipuri de celule, cele implicate în sinteza și secreția de mucine, în special celulele caliciforme, sunt esențiale pentru protejarea mucoasei intestinale.

Inflamația la nivel intestinal poate duce la creșterea permeabilității epitelului, deteriorarea barierei de mucus și modificări ale compoziției microbiotei intestinale, exacerbând astfel starea de dezechilibru apărută în organism. Totodată, inflamația de la nivelul epitelului organelor tractului digestiv determină reducerea numărului de celule cu rol în sinteza de mucine, poate influența capacitatea acestora de a produce glicoproteinele respective, sau poate schimba tipul de secreție al celulelor și implicit raporturile dintre diferitele tipuri de mucine.

Pe scară largă, se vorbește de o potențială abordare terapeutică pentru a susține sănătatea intestinală, și anume utilizarea prebioticelor, precum inulina.

Interacțiunea dintre celulele producătoare de mucine, inflamația intestinală și prebioticele oferă o zonă promițătoare pentru cercetare care vizează gestionarea și tratarea tulburărilor gastrointestinale. Experimentele *in vivo*, pe animalele de laborator, conferă informații esențiale în această direcție.

STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat intitulată „*Evaluarea morfofuncțională a celulelor producătoare de mucină în inflamația intestinală acută*” este structurată în două părți: Partea I - Stadiul actual al cunoașterii și Partea II - Contribuții personale, cuprinzând un număr total de 117 de pagini, 37 figuri, 12 tabele și 139 de referințe.

PARTEA I - Stadiul actual al cunoașterii

Prima parte a tezei de doctorat este structurată în 3 capitole și redă o sinteză a informațiilor cu privire la barierele de protecție la nivelul sistemului digestiv, sintetizând aspecte cu privire la barierele fizice de protecție de la nivelul stomacului, intestinului subțire și a celui gros, precum și detalii despre funcția secretorie a celulelor epitelului gastro-intestinal. Totodată, sunt descrise mecanismele fiziopatologice implicate în procesele inflamatorii, în special în cele de la nivel intestinal. În această parte a tezei se fac referiri la utilizarea și potențialul protector al inulinei fiind aduse argumente pentru utilizarea acesteia în medicină dar și în legătură cu folosirea acesteia în alte domenii.

PARTEA II - Contribuția personală

Partea a II-a este structurată în 6 capitole și are un număr de 63 de pagini. În această parte sunt prezentate ipoteza de lucru și obiectivele generale ale cercetării, materialele și metodele utilizate, rezultatele studiilor efectuate, concluziile generale, recomandările formulate pe baza rezultatelor obținute, originalitatea și contribuțiile inovative a tezei.

IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

Tulburările de ordin morfologic și funcțional ale tractului digestiv, atât la om, cât și la animale, reprezintă o clasă de patologii frecvent întâlnită. Mai mult decât atât, prezența unei inflamații de tip acut, netratată corespunzător, crește semnificativ riscul de apariție a bolilor cronice, atât local cât și sistemic.

Studiile experimentale pe animale, care constau în inducerea inflamației intestinale, sunt cruciale în înțelegerea multiplelor patologii care au loc la acest nivel, putând fi ulterior folosite și în medicina umană. În acest fel se pot realiza cercetări inclusiv în ceea ce privește noi metode de abordare și tratament a acestor tulburări.

Un interes deosebit îl are manipularea și modelarea microbiomului, fiind unul dintre elementele principale care contribuie la menținerea homeostaziei intestinale. Astfel, interesul pentru cercetări legate de impactul antibioticelor, pro- și prebioticele, sau chiar a transferului de fecale a crescut semnificativ.

Având în vedere aceste aspecte, ipoteza de lucru a prezentului studiu a fost analiza celulelor producătoare de mucine într-o tulburare intestinală inflamatorie acută, precum și urmărirea *in vivo* a efectelor inulinei în această situație.

Pentru atingerea obiectivului principal al studiului, au fost luate în calcul următoarele obiective secundare:

1. Realizarea unui screening al structurilor producătoare de mucine, de la nivelul sistemului digestiv, la șobolani, pentru o mai bună înțelegere a morfologiei acestora;
2. Stabilirea unui protocol experimental de inducere a inflamației intestinale acute, prin utilizarea unui reactiv chimic și analiza histologică a leziunilor apărute, precum și observarea histochimică a efectelor inulinei;
3. Inducerea inflamației intestinale acute, precum și administrarea concomitentă de inulină, pentru a observa potențialele ameliorări ale proceselor patologice.

STUDIILE CERCETĂRII

1. Analiza histologică și funcțională a celulelor producătoare de mucină din tractul digestiv, la șobolani.

Activitățile de cercetare ale studiului:

- ✓ Realizarea preparatelor histologice din organele tractului digestiv unde există structuri producătoare de mucine;
- ✓ Colorarea frotiurilor prin metoda Tricrom Goldner (TG);
- ✓ Realizarea analizei morfometrice a celulelor producătoare de mucine.

Rezultatele studiului

Analiza morfometrică a structurilor producătoare de mucine

În urma prelucrării histologice a segmentelor de stomac, intestin subțire și intestin gros, și a colorării acestora prin metoda TG, au fost observate elementele caracteristice fiecărui organ în parte.

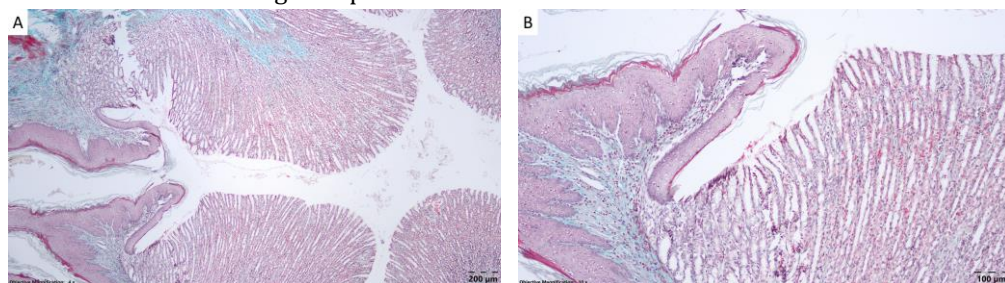


Fig. 1 Aspectul histologic al mucoasei gastrice la șobolani Wistar, colorație TG

A – aspect de ansamblu cu obiectiv 4X; B - aspect mai detaliat cu obiectiv 10X

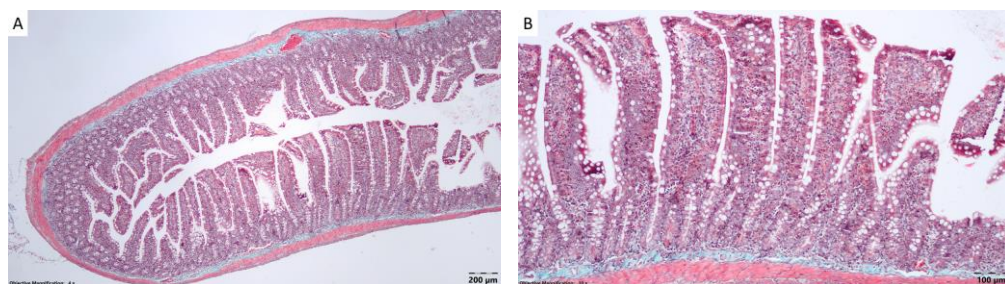


Fig. 2 Aspectul histologic al mucoasei jejunale la șobolani Wistar, colorație TG

A – aspect de ansamblu cu obiectiv 4X; B - aspect mai detaliat cu obiectiv 10X

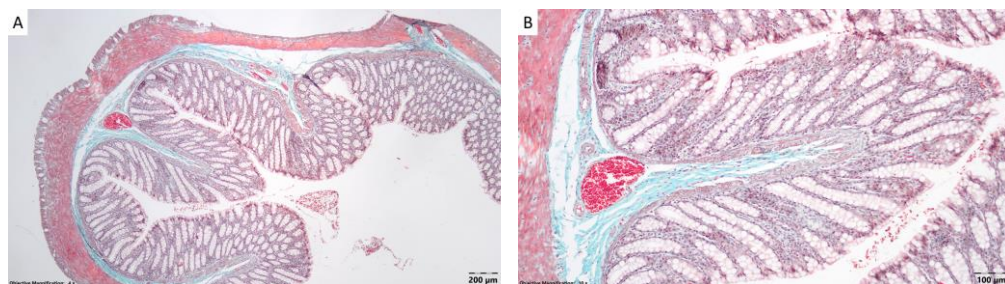


Fig. 3 Aspectul histologic al mucoasei colonului la șobolani Wistar, colorație TG

A – aspect de ansamblu cu obiectiv 4X; B - aspect mai detaliat cu obiectiv 10X

Rezultatele testului pentru distribuția normală a datelor a relevat faptul că acestea sunt normal distribuite, prin urmare nu a fost aplicată nicio corecție asupra datelor.

Analiza comparativă a structurilor producătoare de mucine

Comparația statistică între suprafețele celulare a fost efectuată cu ajutorul testelor One way ANOVA, care sugerează o diferență semnificativă între medii cu $p < 0,0001$, și Tukey's post hoc test.

Tabel 1

Diferențele statistice între suprafețele medii (μm^2) a celulelor producătoare de mucine (Tukey's post hoc test)

Structură anatomică	Medie (μm^2) $\pm$ Deviație standard (μm^2)
Stomac	373,5 $\pm$ 79,09 ^{b, c, d, e}
Celule caliciforme intestin subțire	618,4 $\pm$ 125,6 ^{a, c, e}
DCS-uri intestin subțire	780,3 $\pm$ 177,1 ^{a, b, e}
Celule caliciforme intestin gros	765,5 $\pm$ 155,1 ^{a, e}
DCS-uri intestin gros	1020 $\pm$ 217,3 ^{b, c, d}

Notă: valorile reprezintă media $\pm$ deviația standard pentru 19 măsurători ale celulelor producătoare de mucină. a-e mediile marcate cu litere pe coloană indică diferențele statistice $\leq 0,05$

2. Model experimental de inducere a inflamației intestinale acute cu DSS și de cuantificare/evaluare histochimică a efectului inulinei.

Activitățile de cercetare ale studiului:

- ✓ Identificarea modificărilor morfologice și morfometrice ale celulelor producătoare de mucine, de la nivelul tractului digestiv, în inflamația intestinală indusă, la șobolani.
- ✓ Evaluarea modificărilor induse de administrarea orală de inulină prin cuantificarea celulelor caliciforme în funcție de tipul de secreție al acestora, pe baza preparatelor histochimice.

Rezultatele studiului

Modificările morfologice ale celulelor producătoare de mucine

Leziuni inflamatorii de diferite intensități au fost identificate pe lamele histologice obținute în urma prelevării și prelucrării secțiunilor de intestin subțire (jejun) de la lotul experimental. Acestea au variat de la descuamare epitelială însoțită de apoptoză celulară la nivelul epitelului de suprafață, la necroză de coagulare cu aspect de umbre a epitelului intestinal și infiltrat celular inflamator abundent.

Analiza morfometrică la nivelul intestinului subțire a indicat prezența a 21,78 celule caliciforme în 235721,97 μm^2 suprafață a criptelor, la lotul martor și un număr de 12,22 celule pe o suprafață de 195643,76 μm^2 în cadrul lotului experimental.

Analiza histologică a colonului animalelor din lotul experimental a permis identificarea anumitor leziuni inflamatorii precum descuamarea epitelială cu un nivel ridicat de apoptoză celulară comparativ cu lotul martor, edem discret al laminei propria și spații subepiteliale cu denudare multifocală.

În urma analizei morfometrice s-a observat un număr de 46 de celule caliciforme pe o suprafață de 735627,1 μm^2 la șobolanii din loturile martor și un număr de 16,04 celule pe 40718,7 μm^2 la animalele care au consumat soluție de DSS 5%.

Analiza comparativă a structurilor producătoare de mucine: cuantificare morfometrică și histochimică

Numărul de celule caliciforme cu secreție mixtă a fost mai mic comparativ cu cele cu secreție acidă, indiferent de segmentul analizat, de cantitatea inulinei din soluțiile administrate sau de perioada de administrare a acestora, iar durata intervenției experimentale nu a influențat numărul celulelor, cu excepția celor producătoare de mucine acide din intestinul gros, unde există diferențe semnificative statistic. Când se compară celulele caliciforme mixte din intestinul subțire la 28 de zile între grupuri, și cele acide, tot la 28 de zile, din ambele segmente intestinale, diferențele sunt semnificative din punct de vedere statistic.

3. Efectul inulinei în inflamația intestinală indusă cu DSS, la șobolani.

Activitățile de cercetare ale studiului:

- ✓ Inducerea inflamației intestinale acute și administrarea concomitentă de prebiotic;
- ✓ Evaluarea sporului în greutate și a indicelui de activitate al bolii, la șobolani;
- ✓ Evaluarea examenelor microbiologice;
- ✓ Realizarea preparatelor histologice, histochimice și imunohistochimice din segmente de intestin subțire și intestin gros;
- ✓ Analiza histopatologică a țesuturilor;
- ✓ Cuantificarea celulelor producătoare de mucine în funcție de tipul de secreție al acestora pe preparate histochimice;
- ✓ Evaluarea expresiei markerului MUC2 la nivelul segmentelor analizate, prin tehnici imunohistochimice.

Rezultatele studiului

Evaluarea sporului în greutate și a indicelui de activitate al bolii

Valorile raportului de eficiență a hranei indică faptul că animalele din loturile cu DSS au pierdut în greutate, spre deosebire de șobolanii din lotul cu inulină și cei din lotul martor care au câștigat în greutate pe perioada experimentului.

În cazul loturilor 3 (soluție de inulină 5%) și 4 (martor) scorul DAI este 0, ceea ce denotă faptul că șobolanii din aceste loturi nu au prezentat semne clinice de

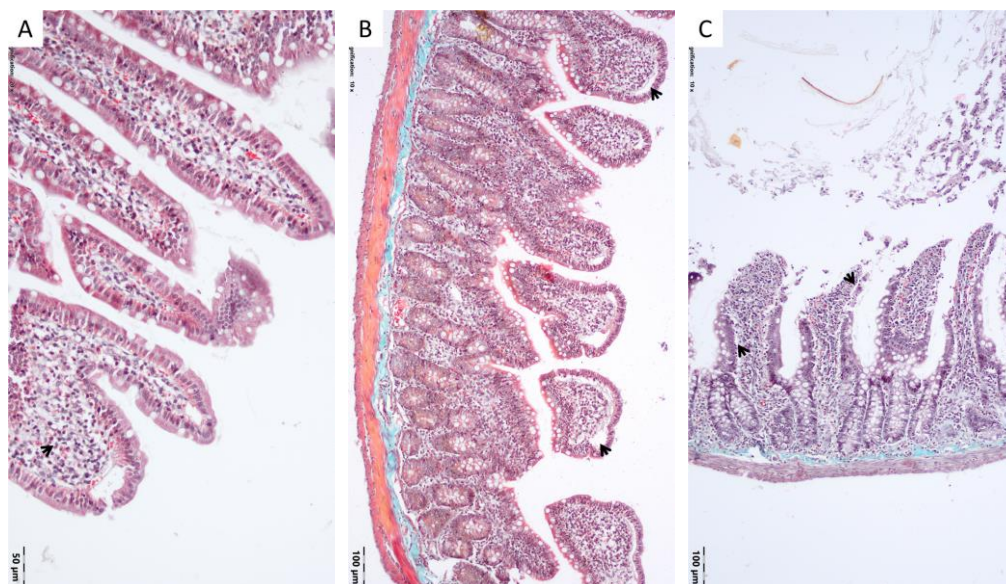
enterocolită pe durata experimentului. La șobolanii care au consumat soluțiile cu DSS 5% (lotul 1 și lotul 2) s-a observat apariția simptomelor începând cu ziua 3 a tratamentului, cu agravarea acestora, scorurile DAI la finalul tratamentului variind între 8 și 9.

Examenul microbiologic

În urma examenului microbiologic s-a observat că flora bacteriană dominantă a fost reprezentată de bacterii intestinale coliforme, bacterii din genul *Enterococcus*, iar sporadic au fost izolate colonii de stafilococi. *Escherichia coli* a avut o prevalență de 100%, fiind identificată la toate loturile experimentale, cantitativ superior la loturile care au consumat soluțiile de DSS, în timp ce bacteriile din genul *Enterococcus* și *Staphylococcus epidermidis* au avut o prevalență de 75%, lipsind la animalele aparținătoare lotului care a primit doar soluția de inulină 5%.

Analiza histopatologică

În urma examenului histopatologic al intestinului subțire de la loturile experimentale s-a observat apariția leziunilor inflamatorii de diferite severități (Fig. 4). Scorul lezional a fost 14 pentru lotul cu soluția de DSS 5%, 13 pentru lotul cu tratamentul cu inulină 5%, ambele având indicatorul moderat, și indicatorul sever lotului cu soluția de DSS 5% și inulină 5%, cu scorul total 21. Inulina a agravat intensitatea leziunilor inflamatorii în cazul administrării concomitente cu soluția de DSS; administrată singură, chiar dacă nu au fost semnalate simptome clinice sau scăderi în greutate a animalelor, histologic au fost observate semne inflamatorii.



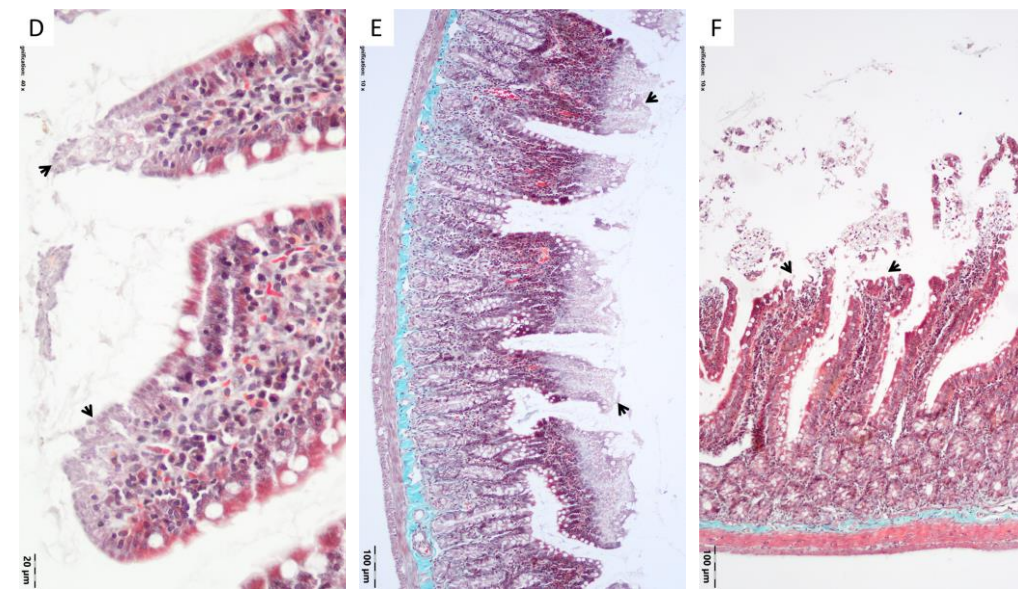


Fig. 4 Examen histopatologic, jejun, șobolani Wistar loturi experimentale, colorație TG

A: congestie și edem în lamina propria (ob. 20X); B: spații subepiteliale (ob. 10X); C: enterită descuamativă (ob. 10X); D: microfocare necrotice (ob. 40X); E: necroză de coagulare cu aspecto de umbre (ob. 10X); F: necroză a epitelului de suprafață și a laminei propria, cu aspect ras al vilozităților (ob. 10x)

Analiza histologică a segmentelor aparținătoare intestinului gros nu a relevat modificări structurale sau apariția leziunilor inflamatorii în cadrul niciunuia dintre loturile experimentale, astfel nici la analiza examenelor histochemic și imunohistochemic nu au apărut diferențe între loturi.

Examenul histochemic

La examenul histochemic s-a observat că celulele caliciforme de la nivelul intestinului subțire și gros au reacții pozitive atât la metoda PAS cât și la colorația AB, la toate loturile experimentale. Acest lucru atestă faptul că acest tip celular sintetizează și secretă atât mucine neutre cât și mucine acide. În urma realizării colorației histochemice PAS-AB a probelor de intestin subțire de la loturile experimentale s-a realizat cuantificarea celulelor cu rol în secreția de mucine neutre și cele cu secreție de mucine mixte (Fig. 5)

Lotul martor a prezentat semnificativ mai multe celule cu secreție de mucine mixte (34,8) și foarte puține celule cu secreție neutră (1,834), ceea ce îl diferențiază de celelalte loturi. În cadrul loturilor experimentale, comparativ cu lotul martor, a fost observată creșterea atât a numărului cât și a procentului de celule cu secreție de mucine neutre raportat la o suprafață totală de 100000 μm^2 , în special în cazul celor cu administrarea soluției de DSS.

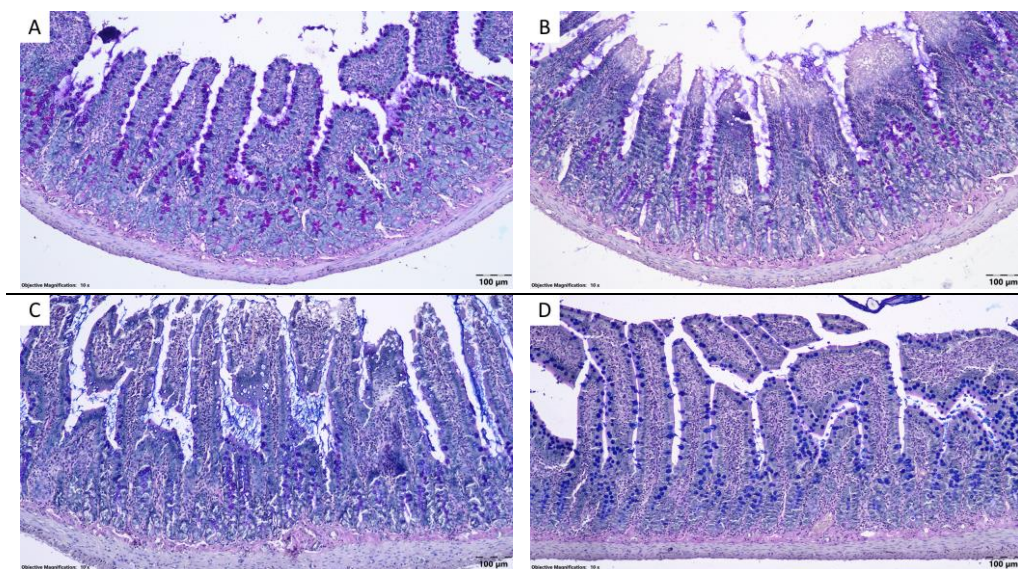


Fig. 5 Colorație PAS-AB, intestin subțire, șobolani Wistar, obiectiv 10X

A: Lot 1 – DSS; B: Lot 2 – DSS + inulină; C: Lot 3 – inulină; D: Lot 4 – martor

Examenul imunohistochimic

Din punct de vedere al distribuției imunoreactivității dintre cele trei loturi experimentale, excluzând cel martor, apreciem că lotul cu administrarea soluției de DSS 5% are cea mai mare proporție de celule cu imunoreactivitate ușor pozitivă „+” și intens pozitivă „++”. În cazul lotului martor se observă lipsa celulelor cu imunoreactivitate absentă „-” și un număr mare de celule cu reacție „++”, ceea ce sugerează o diferență semnificativă față de celelalte loturi. Loturile cu administrarea soluției de inulina 5% (loturile 2 și 3) au o distribuție mai echilibrată între categoriile „-”, „+” și „++”, dar cu diferențe statistice între ele. Analizând comparativ imunoreactivitatea, observăm că lotul martor are cea mai mică imunoreactivitate ușor pozitivă „+”, dar cea mai mare imunoreactivitate intens pozitivă „++”, ceea ce poate indica diferențierea funcțională specifică a celulelor, prin marcarea unei expresii crescute a markerului MUC2. În cadrul loturilor tratate cu soluțiile de DSS 5% și inulină 5% s-a observat scăderea expresiei acestui marker, ceea ce înseamnă reducerea sintezei mucinei MUC2 de către celulele specializate de la nivelul intestinului subțire. Conform testului Bonferroni, lotul cu administrarea soluției de DSS și lotul martor diferă semnificativ în distribuția celulelor „-” și „++”.

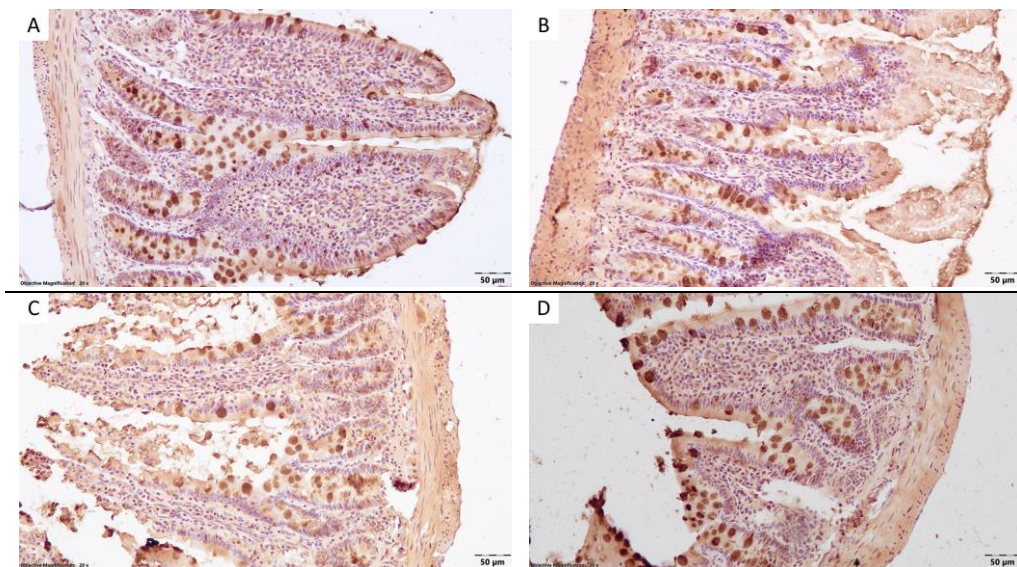


Fig. 6 Reacție imunohistochimică pentru MUC2, intestin subțire, șobolani Wistar, obiectiv 20X

A: Lot 1 – DSS; B: Lot 2 – DSS + inulină; C: Lot 3 – inulină; D: Lot 4 – martor

RECOMANDĂRI

1. Evitarea administrării concomitente a inulinei și a DSS-ului, deoarece aceasta poate agrava inflamația și leziunile intestinale.
2. Monitorizarea atentă a microbiotei intestinale în cazul expunerii la DSS, având în vedere creșterea cantitativă a *Escherichia coli* și *Enterococcus* spp.
3. Investigații suplimentare, pe termen lung, privind efectele inulinei, pentru a determina mecanismele prin care contribuie la modificările histologice intestinale și pentru a clarifica siguranța administrării sale.
4. Utilizarea unor terapii de protecție a epiteliului intestinal, pentru a limita efectele toxice ale inflamației intestinale acute induse cu DSS asupra celulelor producătoare de mucine.
5. Corelarea modificărilor histologice, histochimice și imunohistochimice cu parametri clinici, pentru o mai bună înțelegere a efectelor funcționale asupra organismului.
6. Evaluarea unor strategii de administrare a probioticelor și/sau prebioticele, care să atenueze dezechilibrele microbiene induse de DSS, respectiv ale inflamației intestinale acute.
7. Dezvoltarea unor protocoale terapeutice complexe axate pe protejarea celulelor producătoare de mucine în bolile inflamatorii intestinale.
8. Extinderea studiilor pe alte modele animale sau pe culturi celulare, pentru validarea concluziilor obținute de noi.